



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 24.05.74 (P. 171393)

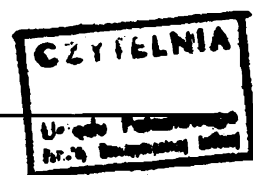
Pierwszeństwo: 24.05.73 dla zastrz. nr 6
Japonia
02.06.73 dla zastrz. nr 7 i 8
Japonia

Zgłoszenie ogłoszono: 02.05.75

Opis patentowy opublikowano: 30.03.1978

MKP C12d 13/06

Int. Cl.²
C12D 13/06



Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Ajinomoto Co., Inc., Tokio (Japonia)

Sposób wytwarzania L-lizyny

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania l-lizyny na drodze fermentacji, a zwłaszcza sposób fermentacyjnego wytwarzania l-lizyny na pożywce z dodatkiem antybiotyków, środków powierzchniowo-czynnych i/lub środków przeciwutleniających.

Celem wynalazku jest opracowanie ulepszanego sposobu wytwarzania l-lizyny na pożywce stanowiącej źródło węgla. l-lizyna jest znana jako niezbędny składnik pożywienia ludzi i zwierząt i spożywane jest jej szerokie zastosowanie do sporządzania i wzbogacania produktów spożywczych.

Znane jest wytwarzanie l-lizyny z węglowodanów ulegających fermentacji przez fermentację przy użyciu mikroorganizmów. Wśród mikroorganizmów produkujących l-lizynę znane są obecnie trzy rodzaje bakterii. Pierwszy rodzaj stanowi mutant *Micrococcus glutamicus*, wymagający jako pożywki homoseryny, metioniny lub treoniny, opisany w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 2 979 439. Drugi rodzaj jest reprezentowany przez mutanty wrażliwe na treoninę lub metioninę i przez wrażliwe na treoninę i wymagające treoniny mutanty, których wzrost jest inhibitowany stężeniem treoniny lub metioniny, lecz te ostatnie wymagają treoniny do wzrostu, jak opisano w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3 616 218. Trzeci rodzaj reprezentowany jest przez mutant odporny na działanie analogów lizyny, takich jak S-(2-aminoetylo)-l-cysteina (ozna-

2

czana dalej skrótem AEC), opisany w opisach patentowych Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3 707 440 i 3 707 441, oraz przez mutant odporny na AEC i wymagający jednego lub więcej środków odżywczych, jak ujawniony w belgijskim opisie patentowym nr 798 890.

Obecnie stwierdzono, że l-lizynę wytwarza się na drodze fermentacji pożywki z mikroorganizmem produkującym l-lizynę przy wartości pH 5—9, zawierającej źródła przyswajalnego węgla i azotu, sole nieorganiczne, substancje konieczne do rozwoju i substancje wzrostowe.

Sposób wytwarzania l-lizyny według wynalazku polega na tym, że fermentację prowadzi się w środowisku antybiotyków i/lub środków powierzchniowo-czynnych i/lub środków przeciwutleniających, a następnie odzyskuje się wytworzoną l-lizynę nagromadzoną w środowisku hodowlanym.

Jako mikroorganizmy produkujące l-lizynę stosuje się wyżej wymienione mutanty szczepów bakterii reprezentowanych przez rodzime szczepy rodzaju *Brevibacterium* i *Corynebacterium*, o koniecznej odporności wobec AEC i/lub wymagające jednego ze składników odżywczych.

Szczepy stosowane w sposobie według wynalazku wytwarza się znanym sposobem przez podanie wegetatywnych komórek macierzystych działaniu światła ultra-fioletowego, promieni-x albo promieni-gamma i przez kontaktowanie szczepów macierzystych z roztworem azotynu sodu, sulfo-

nianem etylometylowym lub N-metylo-N'-nitro-N-nitrozoguanidyną według J. Gen. Appl. Microbial. 13, 349—358 (1967) i w znany sposób selekcjonuje mutanty, które wymagają składnika odżywczego i/lub są odporne na analogi lizyny i/lub wrażliwe na działanie treoniny lub metioniny.

Jako antybiotyki stosuje się chloramphenicol, erytromycynę, oleandomycynę, kauamycynę, streptomycynę, kasugamycynę, tetracyklinę, oksytetracyklinę, mytomycynę C, aktynomycynę D, cykloserynę, związki z grupy penicylin, związki z grupy cefalosporyn, polimiksinę i azaserynę. Stwierdzono, że szczególnie skuteczne w sposobie według wynalazku są antybiotyki, takie jak chloramphenicol, erytromycyna, oleandomycyna, streptomycyna i kasugamycyna, które jak wiadomo reagują z częścią mikroorganizmu syntetyzującą białko.

Jako środki powierzchniowo-czynne stosuje się środki anionowe, takie jak siarczany wyższych alkoholi, alkilobenzenosulfoniany, alkilofosforany, dwualkylsulfopursztyniany i środki kationowe, takie jak sole alkiloaminowe i czwartorzędowe sole amoniowe, środki niejonowe, takie jak alkiloeter polioksyetyleny, sorbitanomonoalkiloeter polioksyetyleny i jednolaurnian sorbitanu, oraz środki amfoteryczne, takie jak imidazol i betaina.

Jako środki przeciwutleniające stosuje się: 4,4'-dihydroksy-3,3'-dwumetylodwufenyl; 2,6-dwu-3-butylofenol; katechinę, butylokatechinę, kwas protokatechowy, α -tokoferol, pirogallol, kwas galusowy, estry kwasu galusowego, naftol, związki fenolowe takie jak aminofenol, aminy takie jak naftyloaminy, dwufenyloamina, dwu-2-butylo-p-fenylendwuamina, 6-etoksy-2,3,4-trójmetylo-1,2-dwuhydrochinolina, semikarbazyd, fenotiazyna i czterofenylhydrazyna, oraz związki zawierające siarkę, takie jak kwas tiowupropionowy i kwas tiowuglikolowy.

Stwierdzono, że ilość l-lizyny gromadzącej się w bulionie hodowlanym, wytwarzanym w znany sposób zwiększa się zwykle dzięki dodaniu do pożywki antybiotyków, środków powierzchniowo-czynnych i/lub środków przeciwutleniających. Nie wiadomo jednak, jak wyjaśnić powód zwiększonego gromadzenia się l-lizyny po wprowadzeniu tych dodatków. Przypuszcza się tylko, że dodatek antybiotyku lub środków powierzchniowo-czynnych wpływa ewentualnie na przepuszczalność ścianek lub błon komórkowych mikroorganizmów produkujących l-lizynę tak, że l-lizyna wytworzona przez mikroorganizm może być uwolniona do środowiska fermentacji oraz, że dodatek środków przeciwutleniających ewentualnie zapobiega dezaktywacji przez utlenianie enzymów, koniecznych do biosyntezy l-lizyny.

Antybiotyki i/lub substancje powierzchniowo-czynne i/lub środki przeciwutleniające dodaje się do środowiska hodowli w takiej ilości, że wzrost mikroorganizmu w środowisku zawierającym te substancje jest dłużej inhibitowany niż w środowisku nie zawierającym wyżej wymienionych dodatków. Dodatki te dodaje się do środowiska hodowli w ilości powodującej zapoczątkowanie wzrostu, kontynuowanie wzrostu lub przerwanie wzrostu mikroorganizmów podczas hodowania.

Stosowana pożywka fermentacyjna jest pożywką naturalną lub sztuczną, zaspokajającą podstawowe potrzeby stosowanych mikroorganizmów wraz ze specyficznym środkiem lub środkami odżywczymi z wymienionej poprzednio grupy.

Odpowiednie źródło węgla stanowią zwykle węglowodany, takie jak glikoza, fruktoza, maltoza, sacharoza, skrobia hydrolizowana, melasa a także kwasy organiczne, zwłaszcza kwas octowy, propionowy, benzoesowy lub fumarowy i alkohole, zwłaszcza metanol, propanol i etanol, przy czym pożywka może zawierać kilka różnych źródeł węgla. Niektóre mutanty przyswajają jako zasadnicze lub uboczne źródło węgla także węglowodory.

Azot dostarcza się w postaci soli amonowych, azotanów, mocznika, aminokwasów, wyciągu namokowego kukurydzy, ekstraktu drożdży, ekstraktu mięsa, mączki rybnej, peptonu, bulionu, hydrolizowanej kazeiny, ich mieszanin, a także w postaci amoniaku.

Niezbędne jony nieorganiczne dostarcza się w postaci siarczanu magnezu, fosforanu sodu, jedno i dwuwodorofosforanów potasu, siarczanu żelaza, chlorku magnezu, chlorku wapnia, chlorku sodu i innych.

Specjalne środki odżywcze, wymagane przez niektóre mutanty, wprowadza się w postaci zawierających je produktów naturalnych, i w postaci prostych pochodnych produktów naturalnych, takich jak hydrolizowane białko sojowe, ekstrakt drożdży, wyciąg namokowy kukurydzy, pepton, hydrolizowana kazeina itp.

Dla optymalnego wytwarzania l-lizyny ważne jest regulowanie wartości pH pożywki fermentacyjnej. Najlepsze wyniki osiąga się, utrzymując wartość pH w zakresie 5—9, co osiąga się zwykle przez dodawanie podczas fermentacji mocznika, amoniaku, węglanu wapnia, a w miarę potrzeby organicznych i nieorganicznych kwasów. Fermentację prowadzi się w temperaturze 24—37°C, chociaż korzystna temperatura w znacznym stopniu zależy od stosowanego mikroorganizmu, w ciągu 2—7 dni w warunkach aerobowych.

Wytworzoną w ten sposób l-lizynę odzyskuje się z bulionu fermentacyjnego w znany sposób, taki jak absorpcja i elucja z jonowymienionych żywic, usuwanie komórek i zateżnienie przesącza zawierającego l-lizynę itd.

L-lizynę, nagromadzoną w bulionie fermentacyjnym identyfikuje się za pomocą reakcji ninhydrynowej na chromatogramie bibułkowym, na podstawie wartości współczynnika R_f na chromatogramie bibułkowym, metodą elektroforezy w próbach mikrobiologicznych i na działanie karboksylazy lizyny jak również przez porównanie z wynikami uzyskanymi przy użyciu ślepych próbek.

Ilość lizyny, wytworzonej w bulionie hodowlanym oznacza się metodą kalorymetryczną, opartą na reakcji ninhydrynowej soli miedzi w kwaśnym środowisku, i przedstawionej w postaci chlorowodoru.

Przykład I. Podstawową pożywką hodowlaną, zawierającą 10% glikozy, 4,5% siarczanu amonu, 0,1% KH_2PO_4 , 0,04% MgSO_4 , 7% H_2O , 2 ppm

Fe⁺⁺, 2 ppm Mn⁺⁺, 50 mg/litr biotyny, 200 mg/litr chlorowodoru tiaminy, 1% hydrolizowanego białka sojowego (o całkowitej zawartości azotu 7%) i 5% węglanu wapnia (sterylizowanego oddzielnie), o wartości pH 8, dzieli się na 20 ml porcje. Do każdej porcji pożywki dodaje się następnie chloramphenicol lub Miranol 2-MCA (nazwa handlowa kationowego środka powierzchniowo-czynnego, wytwarzanego przez firmę Miranol Chemical Co., Inc.) to jest laurylosiarczanu 2-undecylo-N-karboksymetylo-N-(2-karboksymetoksy)-etyloimidazolinotrójmetyloglicyny, jak wskazano dalej, każdą porcję umieszcza się w kolbie do wstrząsania o pojemności 500 ml i sterylizuje się. Porcje pożywki szczepi się odpowiednio Brevibacterium lactofermentum FERMP-1944 (szczep odporny na AEC, pochodzący z Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869) i Corynebacterium glutamicum FERMP-1987 (szczep odporny na AEC, pochodzący z Micrococcus glutamicus ATCC 13032), wychodzącymi poprzednio na agarze bulionowo-glikozowym i wstrząsając prowadzi się hodowlę w temperaturze 31°C. Porcje pożywki dzieli się na dwie grupy.

Do pierwszej grupy porcji pożywki chloramphenicol dodaje się na początku i/lub po 15 godzinach od chwili zaszczepienia, w ilości podanej w tabelicy I. Fermentację prowadzi się w ciągu 72 godzin. Ilość l-lizyny nagromadzonej w bulionie, oznaczoną w postaci chlorowodoru, podano w tabelicy I.

Z bulionu pofermentacyjnego badano ponad 3000 różnych prób szczepów, hodowanych na pożywce bez dodatku antybiotyku, przy czym badano zdolność tych szczepów do wytwarzania l-lizyny. W wyniku tego potwierdzono, że wszystkie te szczepy posiadają odporność na AEC, która jest oryginalną charakterystyczną cechą szczepu i w konsekwencji są zdolne do wytwarzania l-lizyny. Wskazuje to, że w mutancie szczepu, stosowanego nawet po hodowli w ciągu 72 godzin nie występuje powtórna mutacja.

Do drugiej części porcji pożywki dodaje się na początku hodowli lub w ciągu 7 godzin od chwili zaszczepienia wspomniany Miranol 2MCA, w ilości podanej w tabelicy II. Ilość l-lizyny, nagromadzoną w każdej porcji bulionu po fermentacji zakończonej po 72 godzinach przedstawiono w tabelicy II.

Przykład II. Prowadzi się fermentację l-lizyny jak opisano w przykładzie I, z tą różnicą, że do pożywki początkowo dodaje się 0,5 mg/ml erytromycyny, a następnie po 15 godzinach od chwili zaszczepienia 3 mg/ml erytromycyny. Ilość l-lizyny nagromadzonej w bulionie po prowadzeniu hodowli w ciągu 72 godzin podano w tabelicy III.

Przykład III. Prowadzi się fermentację l-lizyny jak opisano w przykładzie I (II) z tą różnicą, że do pożywki dodaje się Tween-20 (nazwa handlowa, pochodna polioksyalkilenowa jednolaurynianu sorbitanu, wytwarzana przez Atlas Powder Co., Inc.), w ilości podanej w tabelicy IV. Ilość l-lizyny nagromadzonej w bulionie po prowadzeniu hodowli w ciągu 72 godzin podano w tabelicy IV.

Przykład IV. Prowadzi się fermentację l-lizyny jak opisano w przykładzie I z tą różnicą, że

stosuje się Brevibacterium lactofermentum FERMP-1711 (odporną na AEC i wymagającą alaniny), Corynebacterium glutamicum FERMP-1613 (odporny na AEC i wymagający seryny) Corynebacterium glutamicum FERMP-1982 (odporny na AEC i wymagający proliny), Brevibacterium lactofermentum FERMP-1857 (odporny na AEC i wymagający alaniny i leucyny), Brevibacterium lactofermentum FERMP-1574 (odporny na AEC i wymagający kwasu nikotynowego lub amidu kwasu nikotynowego) i Brevibacterium lactofermentum FERMP-1575 (odporny na AEC i wymagający hypoksantyny), a antybiotyki dodaje się w sposób podany w tabelicy V.

Ilość l-lizyny, nagromadzonej w bulionie po prowadzeniu hodowli w ciągu 72 godzin podano w tabelicy V.

Przykład V. Prowadzi się fermentację l-lizyny jak opisano w przykładzie I z tą różnicą, że stosuje się Corynebacterium glutamicum FERMP-1613, Corynebacterium glutamicum (wymagający hemoeryny), Brevibacterium lactofermentum FERMP-1572 (odporny na AEC i wymagający seryny i leucyny), Brevibacterium lactofermentum FERMP-1574, Brevibacterium lactofermentum FERMP-1575 oraz Brevibacterium lactofermentum FERMP-1841 (wymagający treoniny). Wymagany środek odżywczy dodaje się jak pokazano w tabelicy VI. Środek powierzchniowo-czynny, przedstawiony w tej samej tabelicy, dodaje się odpowiednio po kultywacji hodowli w ciągu 16 godzin.

Ilość l-lizyny, nagromadzonej w bulionie po prowadzeniu hodowli w ciągu 72 godzin podano w tabelicy VI.

Przykład VI. Prowadzi się fermentację l-lizyny jak opisano w przykładzie I, z tą różnicą, że stosuje się Brevibacterium lactofermentum FERMP-1944, FERMP-1711, FERMP-1572, FERMP-1574, FERMP-1575, FERMP-1841 oraz Corynebacterium glutamicum FERMP-1987, FERMP-1613, FERMP-1982 i w pewnych przypadkach dodaje się składnik odżywczy jak podano w tabelicy VII oraz środki przeciwutleniające w sposób podany w tabelicy VII.

Ilość l-lizyny, nagromadzonej w bulionie po prowadzeniu hodowli w ciągu 72 godzin podano w tabelicy VII.

Przykład VII. Podstawową pożywkę, zawierającą 10% melasy z buraków cukrowych (jako źródło glikozy), 4,5% siarczanu amonu, 0,1% KH₂PO₄, 0,04% MgSO₄·7 H₂O, 2 ppm Mn⁺⁺, 50 mg/litr biotyny, 200 mg/litr chlorowodoru tiaminy, 1,5% hydrolizowanego białka sojowego (o całkowitej zawartości azotu wynoszącej 7%) i 5% węglanu wapnia (sterylizowanego oddzielnie), o wartości pH 8,0 dzieli się na porcje o objętości 20 ml. Każdą z porcji pożywki umieszcza się w kolbie do wstrząsania o pojemności 500 ml i poddaje sterylizacji. Następnie porcje pożywki szczepi się Brevibacterium lactofermentum FERMP-1711, wychodzącymi wcześniej na skosie agarowym bulionowo-glikozowym i prowadzi się hodowlę w ciągu 72 godzin w temperaturze 31°C wstrząsając zawartość kolby, z dodawaniem do pożywki chloramphenicolu, erytromycyny, Mira-

nolu-2. MCA i/lub Tween 20, w sposób podany w tablicy VIII. Ilość l-lizyny, gromadzącej się w bulionie podano w tablicy VIII.

Przykład VIII. Prowadzi się hodowlę *Brevibacterium lactofermentum* FERM-P-1711 jak opisano w przykładzie VII z tą różnicą, że stosuje się pożywkę zawierającą jako źródło glikozy 15% melasy z buraków cukrowych i dodając do niej po 26 godzinach od chwili zaszczepienia 0,1% Miranolu 2 MCA. Po prowadzeniu hodowli w ciągu 90 godzin stwierdzona w bulionie zawartość l-lizyny wynosi 5,8 g/dl. Z drugiej strony, w bulionie z hodowli prowadzonej w ten sam sposób lecz bez

dotatku Miranolu 2 MCA zawartość l-lizyny wynosi 5,2 g/dl.

Przykład IX. Prowadzi się hodowlę *Corynebacterium glutamicum* FERMP-1982 jak opisano w przykładzie VII z tą różnicą, że zamiast melasy z buraków cukrowych stosuje się melasę z trzciny cukrowej a do pożywki w sposób podany w tablicy IX dodaje się tetracyklinę, Nissannion LT 221 lub kwas galusowy.

Ilość l-lizyny nagromadzonej w bulionie po prowadzeniu hodowli w ciągu 72 godzin podano w tablicy IX.

Tablica I

Szczep	Stężenie chloramphenicolu mg/ml		Wzrost (OD)	Pozostałość glikozy (g/dl)	Ilość nagromadzonej l-lizyny (g/dl)	Wydajność obliczona na podstawie zużycia glikozy (%)
	0 godz.	15 godz.				
FERMP-1944	1	0	1,18	0	2,0	20
	2	0	1,18	0,05	2,0	21
	1	5	0,91	0,2	3,1	32
	1	50	0,76	3,5	2,0	31
	0	0	1,25	0	1,8	18
FERMP-1987	1	5	0,95	0,5	3,0	30
	0	0	1,25	0	1,8	18

OD oznacza gęstość optyczną i wskazuje na ilość komórek mikrobiologicznych.

Wzrost: Po rozcieńczeniu do objętości 26 razy większej od objętości początkowej, właściwa gęstość optyczna wynosi 562 μ .

Tablica II

Szczep	Stężenie Miranolu 2 MCA, %		Ilość nagromadzonej l-lizyny (g/dl)
	0 godzin	7 godzin	
FERMP-1944	0,01	0	2,0
	0,05	0	2,3
	0	0,05	2,3
	0	0,1	2,4
	0	0	1,8
FERMP-1987	0,05	0	2,1
	0	0,1	2,5
	0	0	1,8

Tablica III

Szczep	Erytromycyna	Wzrost (OD)	Ilość nagromadzonej l-lizyny (g/dl)
FERM P-1944	dodana	0,94	3,3
	nie dodana	1,25	1,8
FERM P-1987	dodana	0,95	3,1
	nie dodana	1,25	1,8

Uwaga: Wzrost taki sam jak w tablicy I.

Tablica IV

Szczep	Stężenie Tween 20(%)		Ilość nagromadzonej l-lizyny (g/dl)
	0 godzin	7 godzin	
FERM P-1944	0,1	0	2
	0,2	0	2—3
	0	0,1	2,2
	0	0,2	2,5
	0	0	1,8
FERM P-1987	0,2	0	2,4
	0	0,2	2—5
	0	0	1,8

Tablica V

Stosowany mikro-organizm	Dodawany antybiotyk	Wzrost (OD)	Ilość nagromadzonej l-lizyny (g/dl)
Brevi: lactofermentum FERM P-1711	Dwuhydroksystreptomycyna		
	Początkowo: 0,5 mg/ml	0,97	4,7
	Po 24 godzinach 4 mg/ml		
	Bez dodatku	1,05	4,2

Tablica VI (ciąg dalszy)

Stosowany mikro-organizm	Dodawany antybiotyk	Wzrost (OD)	Ilość nagromadzonej l-lizyny (g/dl)
Coryne glutamicum FERM P-1613	Tetracyklina Początkowo 1 mg/ml Po 24 godzinach 7 mg/ml Bez dodatku	1,00 1,00 1,11	2,8 2,5
Coryne glutamicum FERM P-1982	Penicylina Początkowo 1 jednostka/ml Po 20 godzinach: 5 jednostek/ml Bez dodatku	0,93 1,02	3,3 3,0
Brevi. lactofermentum FERM P-1857	Azaseryna Początkowo 5 mg/ml Po 24 godzinach 20 mg/ml Bez dodatku	0,98 1,08	3,4 3,4
Brevi. lactofermentum	Polimiksy-na B Początkowo: 1 jednostka/ml Po 20 godzinach 4 jednostki/ml Bez dodatku	0,93 1,10	3,5 3,0

Tablica VI

Stosowany mikro-organizm	Dodawany składnik odżywczy i jego stężenie (mg/dl)	Dodawany środek powierzchniowy i jego stężenie (%)	Ilość nagromadzonej l-lizyny (g/dl)
1	2	3	4
Coryne. glutamicum FERM P-1613	—	Ryponol LE 110—0,05% Bez dodatku	3,5 3,0
Coryne. glutamicum FERM P-1982	—	Ryponol LL — 0,1% Bez dodatku	3,3 3,0

1	2	3	4
5 Brevi. lactofermentum FERM P-1572	—	Ovanol 516 /0,05% Bez dodatku	5,1 4,6
10 Brevi-lactofermentum FERM P-1574	—	Ryponox NCK — 0,1% Bez dodatku	3,6 3,1
15 Brevi. lactofermentum FERM P-1575	hypo-ksantyna 10 mg/dl	Nissannonion LT 221—0,2% Bez dodatku	3,8 3,0
20 Brevi. lactofermentum FERM P-1841	dl metionina 150 mg/dl	Catinol HTM — 0,01% Bez dodatku	2,9 2,3

Uwaga: Rypon LE — nazwa handlowa, sól etanolaminowa kwasu alkilobenzenosulfonowego (wytwarzana przez Lion Fat and Oil Co., Ltd.).

Ryponol LL 103 — nazwa handlowa, siarczan laurylu (wytwarzany przez Lion Fat and Oil Co., Ltd.). Rypomin LH — nazwa handlowa, amfoteryczny środek powierzchniowo-czynny typu imidazoliny (wytwarzany przez Lion Fat and Oil Co., Ltd.).

Ryponox NCK — nazwa handlowa, alkilofenol-eter polioksyetyleny (wytwarzany przez Lion Fat and Oil Co., Ltd.). Ovanol 516 — nazwa handlowa, amfoteryczny środek powierzchniowo-czynny typu betainy (wytwarzany przez Toho Chemical Industrial Co., Ltd.).

Nissannonion LT 221 — nazwa handlowa, niejonowy środek powierzchniowo-czynny (wytwarzany przez Nippon Oils and Fat Co., Ltd.).

Tablica VII

Stosowany mikro-organizm	Dodawany składnik odżywczy	Dodawany środek przeciwnie- niający i jego stężenie (mg/ml)	Ilość nagromadzonej l-lizyny (g/dl)
55 Brevi. lactofermentum FERM P-1944	—	kwas galusowy dodawany na początku — 0,5% Bez dodatku	2,5 1,8

Stosowany mikro-organizm	Dodawany składnik odżywczy	Dodawany środek przeciwartle- niający i jego stężenie (mg/ml)	Ilość nagromadzo- nej l-lizyny (g/dl)
Brevi. lacto-fermentum FERM P-1711	—	kwas aspara- ginowy + ester laurylowy kwasu galu- sowego Po 12 godzi- nach — 0,05% Bez dodatku	4,6 4,2
Brevi. lacto-fermentum FERM P-1572	—	tiodwuglikol Po 12 godzi- nach — 0,5% Bez dodatku	5,0 4,6
Brevi. lacto-fermentum FERM P-1574	—	α-tokoferol Po 12 godzi- nach — 0,1% Bez dodatku	3,7 3,1
Brevi. lacto-fermentum FERM P-1575	hypoksan- tyna 10 mg/dl	butylohydro- ksyanizol (BHA) Po 12 godzi- nach — 0,05% Bez dodatku	3,4 3,0
Brevi. lacto-fermentum FERM P-1841	dl-me- tionina 150 mg/dl	butyloKate- china Po 12 godzi- nach — 0,1% Bez dodatku	2,7 2,3
Coryne glu- tamicum FERM P-1987	—	kwas proto- katechowy Początko- wo — 1% Bez dodatku	2,2 1,8
Coryne glu- tamicum FERM P-1613	—	butylohydro- ksytoluen Po 12 godzi- nach — 0,05% Bez dodatku	3,3 3,0
Brevi. lacto-fermentum FERM P-1982	—	BHA i kwas tiodwugliko- lowy Po 12 godzi- nach odpo- wiednio 0,02% i 0,1% Bez dodatku	3,8 3,0

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Stosowany mikro-organizm	Dodawany składnik odżywczy	Dodawany środek przeciwartle- niający i jego stężenie (mg/ml)	Ilość nagromadzo- nej l-lizyny (g/dl)
Microc. glu- tamicus ATCC 13286	dl-me- tionina 15 mg/dl	ester etylowy kwasu galu- sowego Po 12 godzi- nach — 0,1% Bez dodatku	4,4 3,8

Tablica VIII

Dodatki		Czas dodawania	Ilość nagromadzo- nej l-lizyny (g/dl)
Nazwa	Stężenie		
Chloram- phenicol	25 mg/ml	17 godzin	4,3
Erytromycyna	15 mg/ml	17 godzin	4,1
Miranol 2 MCA	0,1%	18 godzin	3,9
Tween 20	0,2%	18 godzin	3,8
Chloram- phenicol + Bez dodatku (próbka kontrolna)	0,2% —	—	3,5

Tablica IX

Dodatek		Czas doda- wania	Ilość nagromadzo- nej l-lizyny (g/dl)
Nazwa	Stężenie		
Tetracyklina	15 mg/ml	19 godzin	4,2
Nissannonion LT 221	0,2%	19 godzin	3,6
Kwas galusowy	0,5%	19 godzin	3,5
Bez dodatku (próbka kontrolna)	—	—	3,1

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania l-lizyny na drodze fermentacji pożywki zawierającej źródła przyswajalnego węgla i azotu, sole nieorganiczne, substancje niezbędne dla rozwoju oraz wzrostowe substancje organiczne przy wartości pH 5—9, zna-

mienny tym, że fermentację przeprowadza się z mikroorganizmem należącym do rodzaju *Brevibacterium* lub *Corynebacterium* w obecności antybiotyku w ilości odpowiedniej do zmniejszenia poziomu wzrostu mikroorganizmu do poziomu niższego niż ten, który otrzymuje się przez prowadzenie fermentacji pod nieobecność wymienionych antybiotyków.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się mikroorganizm produkujący L-lizynę odznaczający się co najmniej odpornością na działanie S-(2-aminoetylo)-L-cysteiny.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się mikroorganizm produkujący L-lizynę wymagający co najmniej jednego środka odżywczego, takiego jak homoseryna, treonina, alanina, prolina, seryna, leucyna, kwas nikotynowy lub hypoksantina.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się antybiotyki, takie jak chloramphenicol, erytromycynę, oleandomycynę, kauamycynę, streptomycynę, kasugamycynę, tetracyklinę, oksytetracyklinę, mytomycynę C, aktynomycynę d, cykloserynę, związki z grupy penicylin, związki z grupy cefalosporyn, polimiksinę i azaserynę.

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że antybiotyk dodaje się do pożywki w całości na początku hodowli lub podczas hodowli albo okresowo w trakcie rozwoju mikroorganizmu podczas hodowli.

6. Sposób wytwarzania L-lizyny na drodze fermentacji pożywki zawierającej źródła przyswajalnego węgla i azotu, sole nieorganiczne, substancje niezbędne dla rozwoju oraz wzrostowe substancje organiczne przy wartości pH 5—9, **znamienny tym**, że fermentację przeprowadza się z mikroorganizmem należącym do rodzaju *Brevibacterium* i *Corynebacterium* w obecności środków powierzchniowo-czynnych i/lub przeciwutleniających w ilości odpowiedniej do zmniejszenia poziomu wzrostu mikroorganizmów do poziomu niższego niż ten, który otrzymuje się przez prowadzenie fermentacji pod nieobecność wymienionych środków powierzchniowo-czynnych i/lub przeciwutleniających.

7. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że stosuje się mikroorganizm produkujący L-lizynę odznaczający się co najmniej odpornością na działanie S-(2-aminoetylo)-L-cysteiny.

8. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że stosuje się mikroorganizm produkujący L-lizynę wymagający co najmniej jednego środka odżywczego, takiego jak homoseryna, treonina, metionina, alanina, prolina, seryna, izoleucyna, walina, leucyna, amid kwasu nikotynowego, guanina, hypoksantina lub witamina B12.

9. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że stosuje się środki powierzchniowo-czynne, takie

jak siarczany wyższych alkoholi, alkilobenzenosulfoniany, alkilofosforany, dwualkilosulfobursztyniany, sole alkiloamin, czwartorzędowe sole amoniowe, alkiloeter polioksyetyleny, sorbitanomoalkiloeter polioksyetyleny, jednolaurynian sorbitanu, imidazolinę i betainę.

10. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że stosuje się środki przeciwutleniające, takie jak 4,4'-dihydroksy-3,3'-dimetylodwufenyl, 2,6'-di-3-butylofenol, katechina, butylokatechina, kwas protokatechowy, 2-tokoferol, pirogallol, kwas galusowy, estry kwasu galusowego, naftol, związki fenolu, takie jak aminofenol, aminy, takie jak naftyloaminy, dwufenyloamina, dwu-2-butylo-p-fenylenodwuamina, 6-etoksy-2,3,4-trójmetrylo-1,2-dwuwodorochinolina, semikarbazyd, fenotiazyna i czterofenylohydrazyna, oraz związki zawierające siarkę, takie jak kwas tiodwupropionowy i kwas tio-dwuglikolowy.

11. Sposób według zastrz. 6, **znamienny tym**, że środki powierzchniowo-czynne i/lub przeciwutleniające dodaje się do pożywki w całości na początku hodowli lub podczas hodowli albo okresowo w trakcie rozwoju mikroorganizmu podczas hodowli.

12. Sposób wytwarzania L-lizyny na drodze fermentacji pożywki zawierającej źródła przyswajalnego węgla i azotu, sole nieorganiczne substancje niezbędne dla rozwoju oraz wzrostowe substancje organiczne przy wartości pH 5—9, **znamienny tym**, że fermentację przeprowadza się z mikroorganizmem należącym do rodzaju *Brevibacterium* lub *Corynebacterium* w obecności antybiotyków i środków powierzchniowo-czynnych i przeciwutleniających w ilości odpowiedniej do zmniejszenia poziomu wzrostu mikroorganizmów do poziomu niższego niż ten, który otrzymuje się przez wprowadzenie fermentacji pod nieobecność wymienionych antybiotyków i środków powierzchniowo-czynnych oraz przeciwutleniających.

13. Sposób według zastrz. 12, **znamienny tym**, że stosuje się mikroorganizm produkujący L-lizynę odznaczający się co najmniej odpornością na działanie S-(2-aminoetylo)-L-cysteiny.

14. Sposób według zastrz. 12, **znamienny tym**, że stosuje się mikroorganizm produkujący L-lizynę wymagający co najmniej jednego środka odżywczego, takiego jak homoseryna, treonina, metionina, alanina, prolina, seryna, izoleucyna, walina, leucyna, arginina, histydyna, amid kwasu nikotynowego, kwas pantotenowy, tiamina, guanina, hypoksantina lub witamina B12.

15. Sposób według zastrz. 12, **znamienny tym**, że antybiotyki i środki powierzchniowo-czynne oraz przeciwutleniające dodaje się do pożywki w całości na początku hodowli lub podczas hodowli albo okresowo w trakcie rozwoju mikroorganizmu podczas hodowli.