



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

216 029

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 06 02 81
(21) PV 903-81

(51) Int. Cl.³

C 12 P 13/20

// C 12 P 13/14

(40) Zveřejněno 31 08 81
(45) Vydáno 01 09 84

(75)

Autor vynálezu

SMĚKAL FRANTIŠEK RNDr.CSc.,

PÍRKO JAROMÍR ing.,

NOVÁK LUDVÍK RNDr. PhMr.CSc., PRAHA

(54)

Způsob fermentační přípravy kyseliny L-asparagové anebo L-glutamové

Vynález se týká způsobu fermentační přípravy kyseliny L-asparagové anebo L-glutamové za běžných podmínek, ale s tím rozdílem, že se do živné půdy v průběhu růstové fáze produkčního mikroorganismu přidává antibiotikum peptidového charakteru typu penicilinu G nebo jeho polosyntetický derivát typu cefalexinu.

Kyselina L-asparagová a L-glutamová jsou součástí léčiv a významné výchozí produkty syntézy peptidů.

Vynález se týká způsobu fermentační přípravy kyseliny L-asparagové anebo L-glutamové produkčními kmeny mikroorganismů *Corynebacterium glutamicum* nebo *Brevibacterium flavum*, standardně produkujícími L-lysin, pokud mají v médiu k dispozici homoserin a leucin, popřípadě další aminokyseliny a které jsou současně rezistentní k některým analogům L-lysinu, například S-aminoethyl-L-cysteinu. Tyto mikroorganismy produkují za standardních podmínek L-lysin. Působením některých antibiotik, které jsou přidávána v limitovaném množství do média v růstové fázi kultury, dochází k inhibici syntézy L-lysinu. Za takto upravených podmínek kultivace je asimilovatelný zdroj uhlíku konvertován na jiné aminokyseliny, zejména kyselinu L-asparagovou a kyselinu L-glutamovou nebo jejich směs, které jsou uvolňovány z buněk do prostředí. Hromadění kyseliny L-asparagové probíhá zřejmě v důsledku inhibice některé z enzymatických reakcí v biosyntetické dráze L-lysinu a akumulace kyseliny L-glutamové je vázána na intenzivní transaminaci mezi kyselinou L-asparagovou a alfa-ketoglutarovou. Vznikající kyselina oxalocetová se může dále zapojovat do reakcí Krebsova cyklu.

Na základě uvedených poznatků byl vypracován způsob fermentační přípravy kyseliny L-asparagové nebo L-glutamové produkčními kmeny mikroorganismů *Corynebacterium glutamicum* nebo *Brevibacterium flavum*, standardně produkujícími L-lysin, kultivací v tekuté živné půdě, obsahující zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, minerální živné soli, vitaminy a jiné biofaktory, za submerzních podmínek, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se do živné půdy přidává v průběhu růstové fáze mikroorganismu antibiotikum peptidového charakteru penicilinu G nebo jeho polysyntetický derivát typu cefalexinu, v množství 5 až 50 $\mu\text{g/ml}$ živné půdy, s výhodou 10 $\mu\text{g/ml}$.

Uvedená antibiotika se mohou jako "biotinové regulátory" významně uplatňovat při stimulaci produkce L-lysinu u výše uvedených produkčních kmenů *Corynebacterium glutamicum* a *Brevibacterium flavum*, jsou-li dávkována do fermentačního média v produkční fázi, t.j. po ukončení růstu mikroorganismů. Podobný efekt peptidových antibiotik na produkci kyseliny L-glutamové u *Brevibacterium lactofermentum* je znám, například z japonského pat.spisu č. 7 917 183.

Kyselina L-asparagová je aminokyselina, která se obvykle připravuje enzymaticky, a to působením enzymu L-aspartázy z mikroorganismu *Escherichia coli* nebo z jiných mikroorganismů, biotransformací kyseliny fumarové v přítomnosti amonných iontů. Tento způsob výroby kyseliny L-asparagové je realizovatelný v průmyslovém měřítku, jeho ekonomika je však limitována dostupností výchozí kyseliny fumarové.

Kyselina L-glutamová se připravuje výhradně fermentačním způsobem pomocí kmenů *Corynebacterium* nebo *Brevibacterium* s použitím živných médií obsahujících jako zdroje asimilovatelného uhlíku glukosu, řepnou nebo třtinovou melasu apod. Jednoduchý biosyntetický postup umožňuje až 50% konverzi uhlíkatého zdroje. Dále byly popsány fermentační postupy přípravy kyseliny L-glutamové v živných půdách na bázi náhradních uhlíkatých surovin, jako je kyselina octová, ethanol, lineární uhlovodíky a další uhlíkaté substráty.

Způsob fermentační přípravy kyseliny L-asparagové nebo L-glutamové podle vynálezu pomocí mikroorganismů, které produkují za standardních podmínek L-lysin, indukovaný přidávkou limitovaného minimálního množství peptidových antibiotik, nebyl dosud v literatuře popsán. Je vhodný především tím, že nepotřebuje žádnou zvláštní úpravu produkčních kmenů a fermentační technologie.

Kyselina L-asparagová a L-glutamová slouží jako součást léčiv s významné výchozí produkty syntézy peptidů.

Bližší podrobnosti způsobu podle vynálezu jsou uvedeny v následujících příkladech provedení, které tento způsob pouze ilustrují, ale nijak neomezuji.

Příklad 1

Kmenem *Corynebacterium glutamicum*, který vyžaduje k růstu homoserin a leucin a který je současně rezistentní vůči S-aminoethyl-L-cysteinu, se zaočkuje 50 ml inokulačního média, umístěného v 500 ml varné baňce, jež má toto složení: sacharosa technická 30 g, octan sodný kryst. 20 g, kukuřičný extrakt (60 % hmot. sušiny) 30 g, destilovaná voda do 1 000 ml, pH média po sterilizaci je 7,0 až 7,2. Po zaočkování se dále kultivuje na rotační třepačce (240 ot) (min) při teplotě 39 °C po dobu 18 h; pH kultury se dosáhne hodnoty kolem 7,5.

Vyrostlou kulturou se v množství 10 % obj. zaočkuje 20 ml fermentačního média, umístěného v 500 ml varné baňce, jež má toto složení: sacharosa technická 180 g, hydrolyzát arašidové mouky 300 ml, kukuřičný extrakt (60 % hmot. sušiny) 10 g, síran amonný kryst. 10 g, fosforečnan draselný sekundární 1 g, síran hořečnatý kryst. 0,1 g, uhlíčan vápenatý mletý 30 g, destilovaná voda do 1 000 ml, pH média po sterilizaci je 6,8 až 7,0. Kultivace probíhá za stejných podmínek jako výše. Po 12 hodinách se do média přidá roztok cefalexinu do koncentrace 10 µg/ml. V průběhu kultivace se upravuje pH kultury 10% vodným roztokem čpavku na hodnotu pH 7,0 až 7,2. Po 72 hodinách kultivace se biomasa odstředí a v supernatantu se prokazují kvantitativně jednotlivé aminokyseliny, dále množství L-lysinu, kyseliny L-asparagové a kyseliny L-glutamové.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1:

aminokyselina /g/litr/	kontrola	cefalexin
lysin	22,8	8,0
kyselina asparagová	0,7	12,0
glycin	0,5	0,6
kyselina glutamová	1,0	2,4
alanin	3,2	2,7
valin	1,2	0,5
fenylalanin	0,2	0,2
leucin a isoleucin	0,2	0,2

Jak z této tabulky vyplývá, umožňuje uvedený fermentační postup u kmene *Corynebacterium glutamicum* dosažení produkce kyseliny L-asparagové v množství 12 g/litr fermentačního média za 72 h kultivace.

Příklad 2

Stejným kmenem jako v příkladu 1 se ve stejném inokulačním médiu připraví inokulum a získaným inokulem se zaočkuje fermentační půda rovněž stejného složení. Rozdíl spočívá v tom, že se po 12 hodinách kultivace přidá do fermentačních baňek roztok penicilinu G do koncentrace 10 µg/ml. Po 72 h kultivace se obdobně jako v příkladu 1 stanoví obsah jednotlivých aminokyselin v supernatantu.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2:

aminokyselina /g/litr/	kontrola	penicilin G
lysin	22,5	5,9
kyselina asparagová	0,8	7,2
glycin	0,8	0,2
kyselina glutamová	0,2	15,5
alanin	3,8	3,0
valin	1,8	1,2
fenylalanin	stopy	0,2
leusin a isoleucin	0,2	0,2

Jak z této tabulky vyplývá, umožňuje uvedený fermentační postup u kmene *Corynebacterium glutamicum* dosažení produkce kyseliny L-asparagové 7 g/litr a kyseliny L-glutamové kolem 15 g/litr fermentačního média za 72 h kultivace.

Příklad 3

Produkčním kmenem *Brevibacterium flavum*, který vyžaduje k růstu homoserin a dále je rezistentní vůči analogu L-lysinu, se stejným postupem jako v příkladu 1 připraví inokulum, kterým se zaočkuje fermentační půda stejného složení. Při dalším postupu se po 12 h kultivace přidá do média buď penicilin G nebo cefalexin, a to ve stejném množství jako v příkladu 1 nebo 2. Po 72 h kultivace se obdobně jako v příkladu 1 stanoví obsah jednotlivých aminokyselin.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3:

aminokyselina /g/litr/	Penicilin G	Cefalexin
lysin	5,5	2,2
kyselina asparagová	0,2	0,2
glycin	0,2	0,2
kyselina glutamová	13,0	9,0
alanin	1,0	1,6
valin	1,3	0,7
leucin a isoleucin	0,1	0,2

Jak z této tabulky vyplývá, vyznačuje se kmen *Brevibacterium flavum* tím, že po aplikaci antibiotik produkuje pouze kyselinu L-glutamovou, a to v množství 9 až 13 g/litr fermentačního média za 72 h kultivace.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob fermentační přípravy kyseliny L-asparagové a nebo kyseliny L-glutamové produkčními kmeny mikroorganismů *Corynebacterium glutamicum* nebo *Brevibacterium flavum*, standardně produkujícími L-lysin, kultivací c tekuté živné půdě, obsahující zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, minerální živné soli, vitaminy a jiné biofaktory, za submerzních podmínek, vyznačující se tím, že se do živné půdy přidává v průběhu růstové fáze mikroorganismu antibiotikum peptidového charakteru typu penicilinu G nebo jeho polosyntetický derivát typu cefalexinu, v množství 5 až 50 µg/l živné půdy, s výhodou 10 µg/ml.

Vytiskly Moravské tiskářské závody,
nrovoz 12 Leninova 21. Olomouc

Cena: 2,40 Kč s