



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

195554

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 13/08

/22/ Přihlášeno 16 11 77
/21/ /PV 7544-77/

(10) Zveřejněno 31 05 79

(45) Vydáno 15 04 82

(75)

Autor vynálezu

SMĚKAL FRANTIŠEK RNDr. CSc., PRAHA

(54) Způsob výroby L-lysinu fermentací

1

Vynález se týká způsobu výroby L-lysinu fermentací tekuté živné půdy, obsahující zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku a minerální živné soli, pomocí mikroorganismů produkujících L-lysin, zejména produkčních kmenů *Corynebacterium* sp. nebo *Brevibacterium* sp., za submerzních podmínek. Nejčastěji užívaným zdrojem asimilovatelného uhlíku je sacharóza, výhodným komplexním zdrojem dusíku je kukuřičný výluh, hydrolyzáty arašidové mouky apod.

Protože sacharóza je surovinou poměrně drahou a nedostatečnou, objevují se snahy o její úplnou nebo alespoň částečnou náhradu při výrobě L-lysinu fermentací v průmyslovém měřítku. Fermentační příprava L-lysinu využívající kyselinu octovou v kombinaci s octanem amonným a glukózou ve směsích k dávkování v průběhu fermentace je popsána ve francouzském pat. spise č. 2 033 119 a analogický postup v NSR pat. spise č. 2 100 159. Dále je chráněn fermentační postup biosyntézy L-lysinu s kmeny *Brevibacterium lactofermentum* buď na bázi směsi kyselina octová-octan amonný nebo směsi ethanol-amonné soli, jak je uvedeno v NSR pat. spise č. 2 321 461. Britský pat. spis č. 1 300 654 popisuje přípravu L-lysinu na bázi kyseliny octové a amonných iontů s kmeny *Corynebacterium acetophilum*.

Aplikace dvou syntetických zdrojů asimilovatelného uhlíku, popřípadě jejich kombinace s dalšími syntetickými zdroji uhlíku, které mohou sloužit současně též jako zdroje asimilovatelného dusíku a s anorganickými

2

zdroji dusíku při biosyntéze L-lysinu nebyly dosud popsány.

Významným technicko-ekonomickým úkolem při způsobu výroby L-lysinu fermentací byla náhrada sacharózy, sloužící jako zdroj uhlíku, zdroji jinými, a to buď úplně nebo alespoň částečně, při zachování ekonomicky únosných výtěžků L-lysinu, bez mimořádně náročných zásahů do technologie a bez neuměřeného prodlužování doby fermentace.

Zmíněný úkol řeší způsob výroby L-lysinu fermentací tekuté živné půdy obsahující zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku a minerální živné soli, pomocí mikroorganismů produkujících L-lysin, zejména produkčních kmenů *Corynebacterium* sp. nebo *Brevibacterium* sp., za submerzních podmínek, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se fermentace zahajuje v živné půdě, obsahující jako jediný definovaný zdroj asimilovatelného uhlíku sůl kyseliny octové s alkalickým kovem, s výhodou octan sodný, v množství 35 až 45 g/litr půdy, načež se v dalším průběhu fermentace po dosažení hodnoty pH 8,0 udržuje pH půdy na hodnotě 6,5 až 7,5, s výhodou 6,9 až 7,2, dávkováním vodného roztoku směsi zdrojů asimilovatelného uhlíku a dusíku, obsahující kyselinu octovou a/nebo mléčnou a alespoň jeden další zdroj asimilovatelného uhlíku, který může současně sloužit i jako zdroj asimilovatelného dusíku, jako je například kyselina ϵ -aminokapronová, ethanol, sacharóza, octan amonný, dusičnan amonný, chlorid amonný nebo močovina.

K úpravě pH se v dalším průběhu fermentace jako směs zdrojů asimilovatelného uhlíku a dusíku účelně používá vodného roztoku obsahujícího v objemu 40 ml například:

- a/ 10 g kyseliny octové
7,5 g kyseliny mléčné
2,5 g octanu amonného a
10,0 g kyseliny ξ -aminokapronové, nebo
- b/ 7,5 g kyseliny mléčné nebo octové,
8 g ethanolu a
1,25 g močoviny, nebo
- c/ 7,5 g kyseliny mléčné nebo octové,
8 g ethanolu,
1,25 g močoviny a
10 g sacharózy, nebo
- d/ 7,5 g kyseliny octové,
8 g ethanolu a
2,5 g chloridu amonného, nebo
- e/ 7,5 g kyseliny octové
8 g ethanolu a
2,5 g octanu amonného, nebo
- f/ 7,5 g kyseliny octové,
8 g ethanolu a
2,5 g dusičnanu amonného.

Jak je patrné z následujících příkladů provedení, ve kterých je pro ilustraci uvedeno několik možných kombinací syntetických zdrojů uhlíku a dusíku, lze dosáhnout přijatelných výtěžků L-lysinu. Kromě složení živin závisí výše výtěžku rovněž na použitém produkčním kmeni a jeho přizpůsobivosti změněným fermentačním podmínkám. Jak je dále z příkladů provedení zřejmé, je úplná náhrada sacharózy v živné půdě možná.

P ř í k l a d 1

Kmenem *Corynebacterium glutamicum* se zaočkuje 50 ml inokulačního média, umístěného v 500 ml varné baňce, tohoto složení:

octan sodný	50 g
sacharóza	20 g
kukuřičný výluh 60%	30 g
voda	do 1000 ml
pH po sterilizaci	6,9 až 7,2

Kultivace probíhá na rotační třepačce /220 ot./min/ při 29 až 30 °C po dobu 22 až 24 hod. pH kultury je potom kolem 7,5. Touto kulturou se v množství 10 % obj. naočkuje 20 ml fermentačního média, umístěného v 500 ml varných baňkách, tohoto složení:

octan sodný	40 g
kukuřičný výluh 60%	10 g
hydrolyzát arašidové mouky	150 ml
síran amonný	10 g
kyselý fosforečnan draselný	1 g
síran hořečnatý kryst.	0,1 g
uhličitan vápenatý mletý	30 g
voda	do 1000 ml
pH po sterilizaci	7,2

Kultivuje se na rotační třepačce při 29 až 30 °C po dobu 72 hod. Od 6. hodiny kultivace se do baňek přidává tato směs zdrojů živin:

kyselina octová konc.	10 ml
octan amonný	2,5 g
kyselina mléčná konc.	7,5 ml
kyselina ξ -aminokapronová	10 g
voda destilovaná	do 40 ml

a to vždy tehdy, když pH dosáhne hodnoty okolo 8,0; přidává se tolik směsi, aby se hodnota pH kultury upravila na 6,9 až 7,2. Produkce L-lysinu činí 20,7 až 24,8 gramu/litr média/72 hod fermentace.

P ř í k l a d 2

Postupuje se stejně jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že se od 6. hodiny kultivace v produkční fázi přidává do fermentační půdy tato směs zdrojů živin:

ethanol	10 ml
močovina	1,25 g
kyselina mléčná /nebo kys. octová/	7,5 ml
voda destilovaná	do 40 ml

Dávkuje se obdobně jako v příkladu 1. Produkce L-lysinu činí 17,7 až 20,7 g/litr média/72 hod fermentace.

P ř í k l a d 3

Postupuje se stejně jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že se od 6. hodiny kultivace v produkční fázi přidává do fermentační půdy směs zdrojů živin:

ethanol	10 ml
močovina	1,25 g
kyselina mléčná /nebo kys. octová/	7,5 ml
sacharóza	10 g
voda destilovaná	do 40 ml

Dávkuje se obdobně jako v příkladu 1. Produkce L-lysinu činí 26,4 až 32,5 g/litr média/72 hod fermentace.

P ř í k l a d 4

Postupuje se stejně jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že se od 6. hodiny kultivace v produkční fázi přidává do fermentační půdy tato směs zdrojů živin:

ethanol	10 ml
chlorid amonný	2,5 g
kyselina octová	7,5 ml
voda destilovaná	do 40 ml

Dávkuje se obdobně jako v příkladu 1. Produkce L-lysinu činí 16,2 až 17,7 g/litr média/48 hod fermentace.

P ř í k l a d 5

Postupuje se stejně jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že se od 6. hodiny kultivace v produkční fázi přidává do fermentační půdy tato směs zdrojů živin:

ethanol	10 ml
octan amonný	2,5 g
kyselina octová	7,5 ml
voda destilovaná	do 40 ml

Dávkuje se obdobně jako v příkladu 1. Produkce L-lysinu činí 19,2 až 22,0 g/litr média/72 hod fermentace.

P ř í k l a d 6

Postupuje se stejně jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že se od 6. hodiny kultivace v produkční fázi přidává do fermentační půdy tato směs zdrojů živin:

ethanol	10	ml
dusičnan amonný	2,5	g
kyselina octová	7,5	ml
voda destilovaná do	40	ml

Dávkuje se obdobně jako v příkladu 1. Produkce L-lysinu činí 13,6 až 18,6 g/litr média/48 hod fermentace.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob výroby L-lysinu fermentací tekuté živné půdy obsahující zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku a minerální živné soli, pomocí mikroorganismů produkujících L-lysin, zejména produkčních kmenů *Corynebacterium* sp. nebo *Brevibacterium* sp., za submerzních podmínek, vyznačující se tím, že se fermentace zahajuje v živné půdě, obsahující jako jediný definovaný zdroj asimilovatelného uhlíku sůl kyseliny octové s alkalickým kovem, s výhodou octan sodný, v množství 35 až 45 g/litr půdy, načež se v dalším průběhu fermentace po dosažení hodnoty pH 8,0 udržuje pH půdy na hodnotě 6,5 až 7,5, s výhodou 6,9 až 7,2, dávkováním vodného roztoku směsi zdrojů asimilovatelného uhlíku a dusíku, obsahujícího kyselinu octovou a/nebo mléčnou a alespoň jeden další zdroj asimilovatelného uhlíku, který může současně sloužit i jako zdroj asimilovatelného dusíku, jako je například kyselina ε-aminokapronová, ethanol, sacharóza, octan amonný, dusičnan amonný, chlorid amonný nebo močovina.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako směsi zdrojů asimilovatelného uhlíku a dusíku používá vodného roztoku obsahujícího v objemu 40 ml 10 g kyseliny octové, 7,5 g kyseliny mléčné, 2,5 g octanu amonného a 10 g kyseliny ε-aminokapronové.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako směsi zdrojů asimilovatelného uhlíku a dusíku používá vodného roztoku obsahujícího v objemu 40 ml 7,5 g kyseliny mléčné nebo octové, 8 g ethanolu a 1,25 g močoviny.

4. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako směsi zdrojů asimilovatelného uhlíku a dusíku používá vodného roztoku obsahujícího v objemu 40 ml 7,5 g kyseliny mléčné nebo octové, 8 g ethanolu, 1,25 g močoviny a 10 g sacharózy.

5. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako směsi zdrojů asimilovatelného uhlíku a dusíku používá vodného roztoku obsahujícího v objemu 40 ml 7,5 g kyseliny octové, 8 g ethanolu a 2,5 g chloridu amonného.

6. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako směsi zdrojů asimilovatelného uhlíku a dusíku používá vodného roztoku obsahujícího v objemu 40 ml 7,5 g kyseliny octové, 6 g ethanolu a 2,5 g octanu amonného.

7. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako směsi zdrojů asimilovatelného uhlíku a dusíku používá vodného roztoku obsahujícího v objemu 40 ml 7,5 g kyseliny octové, 8 g ethanolu a 2,5 g dusičnanu amonného.