



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

203769
(11) (B1)

(22) Přihlášeno 18 04 79
(21) (PV 2641-79)

(40) Zveřejněno 30 06 80

(45) Vydáno 15 06 83

(51) Int. Cl.³
C 12 P 13/08

(75)

Autor vynálezu

SMÉKAL FRANTIŠEK RNDr. CSc., PRAHA

(54) Způsob fermentační přípravy L-lysinu

1

Vynález se týká způsobu fermentační přípravy L-lysinu kultivací produkčních kmenů *Brevibacterium flavum* na tekutých živných půdách obsahujících zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, minerální živné látky a růstové faktory.

Fermentační příprava L-lysinu, aminokyseliny tvořící nezbytnou složku racionální výživy hospodářských zvířat v moderních velkochovech, pomocí různých produkčních mikroorganismů, je známá především z patentové literatury. Jako hlavní zdroj asimilovatelného uhlíku byla popsána například glukosa [USA patent č. 1 258 380] nebo melasa (švýcarský patent č. 535 831) s použitím kmenů, které jsou dependentní na některé aminokyseliny a současně rezistentní ke specifickým analogům (například lysinu nebo threoninu). Dále byla popsána fermentační příprava [USA patent č. 3 687 810] L-lysinu na bázi melasy jako hlavního zdroje uhlíku, s produkčními kmeny, které jsou rezistentní na určité koncentrace některých antibiotik (například penicilinu, bacitracinu aj.). Kombinace různých uhlíkatých zdrojů při fermentaci L-lysinu s použitím melasy a hydrolyzátu rašeliny je rovněž známa (sovětský patent č. 496 300).

Nejlépších výtěžků při fermentační přípravě L-lysinu se dosahuje při použití živných

2

půd obsahujících jako hlavní zdroj asimilovatelného uhlíku sacharosu. Poněvadž se nověji stává sacharosa drahou a deficitní surovinou, tedy limitujícím faktorem ekonomiky biosyntetické výroby L-lysinu, objevují se stále častěji snahy nahradit tuto surovinu alespoň částečně jinými zdroji, snáze dostupnými a levnějšími, a to i za cenu nižších výtěžků fermentace.

Uvedený úkol řeší způsob fermentační přípravy L-lysinu kultivací produkčních kmenů *Brevibacterium flavum* na tekutých živných půdách obsahujících zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, minerální živné látky a růstové faktory, podle vynálezu. Podstata tohoto způsobu spočívá v tom, že se fermentace zahajuje na živné půdě s počátečním obsahem 10 až 18 % hmot. sacharosu, přičemž 40 až 50 % hmot. z tohoto množství tvoří sacharosa obsažená v melase, načež se v průběhu fermentace po dosažení hodnoty pH média 7,8 až 8,0 dávkuje do živné půdy směs melasy a 30 až 40% roztoku sacharosu v objemovém poměru 1 : 1 až 1 : 2, v množství 1 až 2 % obj., vztaženo na výchozí objem půdy za současné úpravy pH půdy na hodnotu 7,0 až 7,2 přidávkou čpavkové vody, přičemž každá následující dávka směsi melasy a roztoku sacharosu se přidává k půdě vždy po poklesu koncentrace

redukujících cukrů na hodnotu 3 až 5 mg/ml, a to až do ukončení produkční fáze.

Při provedení způsobu podle vynálezu se poměr mezi melasou a roztokem sacharosy ve směsi dávkované do fermentačního média řídí jednak obsahem sacharosy v melase, jednak proměnlivým obsahem balastů v této surovině, které by mohly negativně působit na produkční mikroorganismus. V závislosti na tom se také upravuje způsob dávkování této kombinace do půdy v průběhu fermentace.

Při způsobu fermentační přípravy L-lysinu podle vynálezu se podle použitého kmeny, kvality melasy i poměru melasy k roztoku sacharosy dosahuje výtěžků L-lysinu v rozmezí 48 až 53 g/litr média.

Bližší podrobnosti způsobu podle vynálezu vyplývají z následujících příkladů provedení, které tento způsob pouze ilustrují, ale nijak neomezuji.

Příklady provedení

Příklad 1

Produkčním kmenem *Brevibacterium flavum*, který vyžaduje k růstu homoserin a který je rezistentní k S-aminoethyl-L-cysteinu, se zaočkuje 60 ml inokulačního média v 500 ml varných baňkách, jež má toto složení (g/litr):

glukosa	40
močovina	3
prim. fosforečnan draselný	0,5
sek. fosforečnan draselný	1,5
síran hořečnatý kryst.	0,5
pepton	15
hovězí extrakt	5
voda	do 1000 ml
pH po sterilizaci	7,2 až 7,5.

Po zaočkování probíhá kultivace v baňkách při 29 °C na rotační třepačce (240 vt./min.) po dobu 18 hodin. Narostlou kulturou se zaočkuje 600 ml fermentačního média v laboratorním fermentačním tanku o objemu 2 litrů. Médium má toto složení (g/litr):

melasa	100
sacharosa	20
močovina	3
síran hořečnatý kryst.	0,2
sek. fosforečnan draselný	0,9
hydrolyzát arašídové mouky	300 ml
uhlíčitán vápenatý mletý	30
thiamin	100 µg
biotin	50 µg
voda vodovodní	do 1000 ml
pH po sterilizaci	7,0 až 7,2.

Po zaočkování probíhá kultivace v tancích při 29 °C, při vzdušnění 1 objemem vzduchu, za míchání 800 ot./min. Po 18 hodinách kultivace se do fermentačního tanku dává

směs 60% melasy a 35% roztoku sacharosy v objemovém poměru 1 : 1, a to ve tříhodinových intervalech v množství 10 ml/tank a současně se upravuje pH fermentačního média čpavkovou vodou na hodnotu 7,0 až 7,2. Produkce L-lysinu dosahuje 52,8 g/litr média v 96. hodině fermentace.

Příklad 2

Z kmene *Brevibacterium flavum* se analogicky jako v příkladu 1 připraví inokulum. Kultury vyrostlé v baňkách se použijí k přípravě očkovacího materiálu pro vlastní fermentaci. Složení očkovacího média (očkovací tank, g/10 litrů):

glukosa	400
prim. fosforečnan draselný	5
sek. fosforečnan draselný	15
močovina	30
síran hořečnatý kryst.	5
pepton	200
hovězí extrakt	50
biotin (jako 1% roztok)	50 mg
voda vodovodní	do 10 litrů
pH po sterilizaci	7,0 až 7,2.

Kultivace probíhá při 29 °C, po dobu 18 hodin, při 400 ot./min. a vzdušnění 1 objemem vzduchu. Vyrostlou kulturou se v množství 10 % obj. zaočkuje 10 litrů fermentačního média ve fermentačním tanku o objemu 20 litrů; médium má toto složení (g/10 litrů)

melasa	1000
sacharosa	200
močovina	30
síran hořečnatý kryst.	3
prim. fosforečnan draselný	7
uhlíčitán vápenatý mletý	300
hydrolyzát arašídové mouky	3000 ml
biotin (jako 1% roztok)	50 mg
voda vodovodní	do 10 litrů
pH po sterilizaci	7,2.

Fermentace probíhá za těchto podmínek: teplota 29 °C, míchání 470 ot./min., vzdušnění 1 objemem vzduchu. Při poklesu na hodnotu 6,7 se pH upraví čpavkovou vodou na 7,0 až 7,2. V průběhu fermentace se od 24. hodiny dává v tříhodinových intervalech směs 400 ml konc. melasy a 600 ml 35% roztoku sacharosy, a to v množství 200 ml/tank. Produkce L-lysinu dosahuje 48,6 až 51,4 g/litr média v 96. hodině fermentace.

Příklad 3

Produkční kmen *Brevibacterium flavum* podle příkladu 1, vystavený působení nitrosomethylmočoviny, kultivovaný podle podmínek příkladu 1, poskytl produkci lysinu 43,7 g/litr média. Při kultivaci za podmínek jako v příkladu 2 se produkce pohybovala mezi 44 až 46 g/litr média, v obou případech po 96 hodinách fermentace.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob fermentační přípravy L-lysinu kultivací produkčních kmenů *Brevibacterium flavum* na tekutých živných půdách obsahujících zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, minerální živné látky a růstové faktory, vyznačující se tím, že se fermentace zahajuje na živné půdě s počátečním obsahem 10 až 18 % hmotnostních sacharosy, přičemž 40 až 50 % hmotnostních z tohoto množství tvoří sacharosa obsažená v melase, načež se v průběhu fermentace po dosa-

žení hodnoty pH média 7,8 až 8,0 dává do živné půdy směs melasy a 30 až 40% roztoku sacharosy v objemovém poměru 1 : 1 až 1 : 2, v množství 1 až 2 % objemové, vztaženo na výchozí objem půdy, za současné úpravy pH půdy na hodnotu 7,0 až 7,2 přidávkou čpavkové vody, přičemž každá následující dávka směsi melasy a roztoku sacharosy se přidává k půdě vždy po poklesu koncentrace redukujících cukrů na hodnotu 3 až 5 mg/ml, a to až do ukončení produkční fáze.