



Eljárás bázikus aminosav előállítására

Kivonat

A találmány tárgya eljárás bázikus aminosav előállítására, amelyben a bázikus aminosav termelésére képes mikroorganizmust tenyésztenek folyékony tápközegben, aerob körülmények mellett úgy, hogy a bázikus aminosav a tápközegben termelődjék és abban felhalmozódjék; ahol a tápközeg pH-értékét a tenyésztés során 6,5 és 9,0 közt, a tenyésztés végén pedig 7,2 és 9,0 közt tartják; és a tenyésztés során olyan tenyésztési időszaktól biztosítanak, amelyben 2 g/l vagy több hidrogénkarbonát-ion és/vagy karbonátion van jelen a tápközegben úgy, hogy a fermentáció során a nyomás szabályozásával pozitív nyomást hoznak létre a fermentációs tartályban, vagy széndioxidgázt vagy széndioxidgázt tartalmazó kevert gázt juttatnak a tápközegbe, miáltal a keletkező hidrogénkarbonát-ionok és/vagy karbonátionok az elsősorban a bázikus aminosavból álló kationok ellenanionjaiként funkcionálhatnak.

jellemző a bázikus

ben



Eljárás bázikus aminosav előállítására

A találmány tárgya eljárás bázikus aminosav előállítására fermentációval, valamint a fermentációval előállított bázikus aminosav. Bázikus aminosavak, például az L-lizin, alkalmazhatóak állati tápok adalékaként, az L-arginin és L-hisztidin pedig alkalmasak gyógyászati készítmények, például infúziók előállítására.

A bázikus aminosavak fermentációval történő előállítására alkalmas eljárásokban bázikus aminosav termelésére képes mikroorganizmusokat tenyésztünk, miáltal a bázikus aminosav termelődik, és a tenyészet felülúszójában halmozódik fel, majd a bázikus aminosavat a tenyészet felülúszójából kinyerjük. Az ilyen eljárásokban, a tenyésztést szakaszos üzemmódú tenyészetben, adagolós üzemmódú tenyészetben vagy folyamatos tenyészetben végezhetjük.

Amikor bázikus aminosavakat állítunk elő fermentációval, szokásosan szulfátionok vagy kloridionokat adunk a tápközeghez ellen-anionokként az elektromos semlegesség fenntartására. Szulfátionokat elsősorban ammónium-szulfátként adunk a tápközeghez [lásd az 5-30985 és 5-244969 számon közzétett japán szabadalmi leírásokat (Kokai)].

A legtöbb esetben, amennyiben tisztításra van szükség, a bázikus aminosavakat ioncserélő eljárással nyerjük ki a tenyésztő tápközegből. L-lizin esetében például, miután a fermentációs tápközeg enyhén savassá vált, az L-lizint ioncserélő gyantára adszorbeáltatjuk, majd a gyantáról ammóniumionokkal deszorbeáltatjuk. Az ily módon deszorbeáltatott L-lizint lizinbázisként alkalmazzuk, vagy sósav alkalmazásával L-lizin-



-hidrokloridként kristályosítjuk.

Másrészt, amennyiben tisztítási lépést nem alkalmazunk, a fermentációs közeget eredeti formájában koncentrálnak, vagy pedig miután sósav vagy kénsav hozzáadásával enyhén savanyítottuk, porlasztva granulálásnak vetjük alá. Ebben az esetben, mivel a fermentációval kapott termék bázikus aminosavtartalmát a tápközegben visszamaradt egyéb komponensek korlátozzák, a tápközeghez adott ellenanionok mennyisége nem elhanyagolható. Nem csak az előállítási költségek, hanem a termék minősége szempontjából is fontos tehát, hogy az alkalmazott ellenanionok mennyiségét csökkentsük.

Mellékesen, a mikroorganizmusok nagy mennyiségű széndioxidgázt bocsátanak ki a fermentáció során fiziológiás metabolizmus, például respiráció révén. A 11-243985 számon közzétett japán szabadalmi leírásban olyan eljárás ismertetését találjuk, amely alkalmas az L-glutaminsav fermentációja során keletkező széndioxidgáz megkötésére; az említett eljárásban nátrium-hidrogénkarbonátot és/vagy nátrium-karbonátot reagáltatnak vizes közegben L-glutaminsav fermentációs tápközegében termelődött és abból kinyert L-glutaminsavval, miáltal nátrium-L-glutamátot kapnak, ezzel egyidőben megkötik a másodlagos termékként keletkező széndioxidgázt. A széndioxidgáz azonban nem használódik fel hatékonyan a fermentáció során.

Célul tűztük ki eljárás kidolgozását, amely alkalmas bázikus aminosavak fermentációval történő előállítása során a tápközeghez adandó ellenanionok mennyiségének csökkentésére.

Azt találtuk, hogy a hozzáadott ellenanionok mennyisége csökkenthető, és a fermentáció során keletkező széndioxidgáz hatékonyan alkalmazható oly módon, hogy ellenanionok, például



szulfátionok helyett a széndioxidgázt alkalmazzuk.

A találmány tárgyát képezik tehát az alább felsoroltak.

(1) A találmány tárgyát képezi eljárás bázikus aminosav vagy a bázikus aminosavat tartalmazó fermentációs tápközeg vagy fermentációs termék előállítására fermentációval, amely szerint a bázikus aminosav termelésére képes mikroorganizmust tenyésztünk folyékony tápközegben, aerob körülmények mellett úgy, hogy a bázikus aminosav a tápközegben termelődjék és abban felhalmozódjék; ahol:

a tápközeg pH-értékét a tenyésztés során 6,5 és 9,0 közt, a tenyésztés végén 7,2 és 9,0 közt tartjuk; és

a tenyésztés során olyan tenyésztési időszakot biztosítunk, amelyben 2 g/l vagy több hidrogénkarbonátion és/vagy karbonátion van jelen a tápközegben úgy, hogy a fermentációs tartályban uralkodó nyomás szabályozásával a fermentáció során pozitív nyomást hozunk létre a tartályban, vagy pedig széndioxidgázt vagy széndioxidgázt tartalmazó kevert gázt juttatunk a tápközegbe, ezáltal a hidrogénkarbonátionok és/vagy karbonátionok az elsősorban a bázikus aminosavak képezte kationok ellenanionjaiként funkcionálhatnak.

(2) A találmány tárgyát képezi továbbá az (1) pontban ismertetett eljárás bázikus aminosav vagy a bázikus aminosavat tartalmazó fermentációs tápközeg vagy fermentációs termék előállítására, amely szerint a fermentációs tartályban 0,03-0,2 MPa nyomást hozunk létre.

(3) A találmány tárgyát képezi továbbá az (1) vagy (2) pontban ismertetett eljárás bázikus aminosav vagy a bázikus aminosavat tartalmazó fermentációs tápközeg vagy fermentációs termék előállítására, amely szerint bázikus aminosavként L-li-



zint, L-arginint és/vagy L-hisztidint állítunk elő.

(4) A már említetteken felül, a találmány tárgyát képezi bázikus aminosavat tartalmazó fermentációs tápközeg, amely a bázikus aminosav termelésére képes mikroorganizmus fermentációjával van előállítva folyékony tápközegben, aerob körülmények között; vagy fermentációs tápközegből előállított fermentációs termék, amely hidrogénkarbonátionokat és/vagy karbonát-ionokat tartalmaz az elsősorban a bázikus aminosavakból álló kationok ellenanionjaiként, ahol a normálkoncentrációk aránya 5-80% az alábbi képlet alapján:

normálkoncentrációk aránya = [hidrogénkarbonát-ionok és/vagy karbonát-ionok normálkoncentrációja]/[az elsősorban a bázikus aminosavakból álló kationok normálkoncentrációja]x100.

(5) A találmány tárgyát képezi továbbá a (4) pontban ismertetett, bázikus aminosavat tartalmazó fermentációs tápközeg vagy fermentációs termék, amely bázikus aminosavként L-lizint, L-arginint és/vagy L-hisztidint tartalmaz.

(6) Ezen felül, a találmány tárgyát képezi bázikus aminosavat tartalmazó fermentációs tápközeg vagy fermentációs termék, amelyet úgy állítunk elő, hogy a (4) pontban ismertetett, bázikus aminosavat tartalmazó fermentációs tápközegből vagy fermentációs termékből a széndioxidgázt felszabadítjuk.

A találmány szerinti megoldással összhangban, az ipari vegyületek, például ammónium-szulfát felhasznált mennyisége csökkenthető, ezáltal bázikus aminosavak alacsony költséggel állíthatók elő. Továbbá, bár a kapott fermentációs tápközeg karbonátionokat és/vagy hidrogénkarbonát-ionokat is tartalmaz, azok melegítéssel könnyen eltávolíthatók a légtérbe. Ezáltal, magas aminosav-koncentrációjú fermentációs tápközeget vagy



fermentációs terméket kaphatunk szilárd formában.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leíráshoz csatolt ábrákat.

Az 1. ábrán szulfátionok, valamint karbonátionok és hidrogénkarbonát-ionok normálkoncentrációja arányának alakulását ábrázoltuk az elsősorban lizin aminosavakból álló kationok normálkoncentrációjához viszonyítva az 1. példában és az 1. összehasonlító példában alkalmazott fermentációs tápközegben és fermentációs tankban uralkodó nyomás mellett.

A 2. ábrán szulfátionok, valamint karbonátionok és hidrogénkarbonát-ionok normálkoncentrációja arányának alakulását ábrázoltuk az elsősorban lizin aminosavakból álló kationok normálkoncentrációjához viszonyítva a 2. példában és a 2. összehasonlító példában alkalmazott fermentációs tápközegben és fermentációs tankban uralkodó nyomás mellett.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a találmány szerinti megoldást.

A találmány szerinti eljárásban karbonátionokat és/vagy hidrogénkarbonát-ionokat alkalmazunk a bázikus aminosavak fő ellenanionjaiként a bázikus aminosavak fermentációval történő előállításakor, amely szerint bázikus aminosavak termelésére képes mikroorganizmust tenyésztünk folyékony tápközegben, aerob körülmények mellett úgy, hogy a bázikus aminosav a tápközegben termelődjék és abban felhalmozódjék.

A találmány szerinti eljárással bázikus aminosavként L-lizint, L-arginint és/vagy L-hisztidint állítunk elő.

A találmány szerinti eljárásban bázikus aminosav termelésére képes mikroorganizmusként bármely mikroorganizmust alkalmazhatunk, amely képes bázikus aminosav termelésére fermentá-



cióval. Ilyen mikroorganizmusok például coryneform baktériumok, vagy az *Escherichia*, *Serratia*, *Bacillus* stb. nemzetségekhez tartozó baktériumok. Bár a találmány szerinti megoldást az alábbiakban coryneform és *Escherichia* baktériumok alkalmazásán keresztül szemléltetjük, a találmány szerinti eljárásban alkalmazható baktériumok köre nem korlátozódik az említettekre.

Coryneform baktériumok közé sorolunk mindezideig a *Brevibacterium* nemzetségbe sorolt, de újabban a *Corynebacterium* nemzetségébe átsorolt baktériumokat [Int. J. Syst. Bacteriol., 41:255 (1981)]; ide sorolunk továbbá a *Brevibacterium* nemzetségbe sorolt, a *Corynebacterium* nemzetséggel közeli rokonságot mutató baktériumokat. Ilyen coryneform baktériumok például a felsoroltak:

Corynebacterium acetoacidophilum;

Corynebacterium acetoglutamicum;

Corynebacterium alkanolyticum;

Corynebacterium callunae;

Corynebacterium glutamicum;

Corynebacterium lilium (*Corynebacterium glutamicum*);

Corynebacterium melassecola;

Corynebacterium thermoaminogenes;

Corynebacterium herculis;

Brevibacterium divaricatum (*Corynebacterium glutamicum*);

Brevibacterium flavum (*Corynebacterium glutamicum*);

Brevibacterium immariophilum;

Brevibacterium lactofermentum (*Corynebacterium glutamicum*);

Brevibacterium roseum;

Brevibacterium saccharolyticum;

Brevibacterium thiogenitalis;

Brevibacterium album;

Brevibacterium cerinum; és

Microbacterium ammoniophilum.

Escherichia nemzetségbe tartozó baktériumként megemlíten-
dő az *Escherichia coli*.

L-lizin termelésére képes coryneform baktériumok például S-(2-aminoetil)cisztein-rezisztens mutáns törzsek (a továbbiakban „AEC”); növekedésükhöz aminosavakat, például L-homoszerin aminosavat igénylő mutáns törzsek, [lásd a 48-28078 és 56-6499 számú japán szabadalmi leírásokat (Kokoku)]; AEC-rezisztens, és növekedésükhöz aminosavakat, például L-leucint, L-homoszerint, L-prolint, L-szerint, L-arginint, L-alanint vagy L-valint igénylő mutáns törzsek [lásd a US-3 708 395 és az US-3 825 472 számú szabadalmi leírást]; DL- α -amino- α -kaprolaktámra, α -amino-laurillaktámra, aszpartinsav-analógra, szulfa-származéokra, quinoindra és N-laurilleucinre rezisztens, L-lizint termelő mutáns törzsek; oxálacetát-dekarboxilázra vagy respiratorikus rendszer eredetű enziminhibitorra rezisztens, L-lizint termelő törzsek (50-53588, 50 31093, 52-102498, 53-9394, 53-86089, 55-9783, 55-9759, 56-32995, 56-39778 számon közzétett japán szabadalmi leírások, valamint 53-43591 és 53-1833 számú japán szabadalmi leírások); inozitot vagy acetátot igénylő L-lizin-termelő mutáns törzsek (55-9784 és 56-8692 számon közzétett japán szabadalmi leírások); fluor-piro-szőlősavra vagy 34°C-os vagy annál magasabb hőmérsékletre érzékeny L-lizin-termelő mutáns törzsek (lásd 55-9783 és 53-86090 számon közzétett japán szabadalmi leírások); etilén-glikolra rezisztens L-lizin-termelő mutáns *Brevibacterium* vagy *Corynebacterium* törzsek (333 455 számú egyesült államokbeli szaba-



dalmi bejelentés) stb. Közelebbről, alkalmazhatjuk az ATCC gyűjteményében 31 269 számon szereplő *Brevibacterium lactofermentum* törzset, az ATCC gyűjteményében 21 475 számon szereplő *Brevibacterium flavum* törzset vagy az ATCC gyűjteményében 21 491 számon szereplő *Corynebacterium acetoglutamicum* törzset.

Escherichia nemzetséghez tartozó, L-lizint termelő baktériumok például egy L-lizin-analógra rezisztens mutáns törzsek. Ez az L-lizin-analóg olyan vegyület, amely gátolja az *Escherichia* nemzetséghez tartozó baktériumok növekedését, de a gátlás teljesen vagy részben megszűnik, ha L-lizin van jelen a tápközegben. Ilyen vegyületek például az oxalizin, lizin-hidroxamát, (S)-2-aminoetil-L-cisztein (AEC), γ -metillizin, α -klórkaprolaktám stb. A fenti L-lizin-analógokra rezisztens mutáns törzseket szokásos mesterséges mutációs technológiákkal nyerhetünk az *Escherichia* nemzetséghez tartozó mikroorganizmusokból. L-lizin termelésére alkalmazható baktériumtörzsek például a következők: *Escherichia coli* AJ11442 (FERM BP-1543, NRRL B-12185; lásd 56-18596 számon közzétett japán szabadalmi leírást, valamint az US-4 346 170 számú szabadalmi leírást), és az *Escherichia coli* VL611. Az AJ11442 törzs 1981.05.01-jén, FERM P-5084 nyilvántartási számon lett letétbe helyezve a „National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Technology” (jelenleg: független igazgatási testület; „National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary”) gyűjteményében (Chuo Dai-6, 1-1 Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japán, 305-5466). Ezután, a törzs a budapesti



egyezménnyel összhangban, 1987.10.29-én a letétbe helyezés eredeti helyéről nemzetközi gyűjteménybe lett áthelyezve, ahol az a FERM BP-1543 nyilvántartási számot kapta. A fenti mikro-organizmusokban, az aszpartokináz „feedback” (visszacsatolási) gátlása L-lizinnel megszűnt.

L-lizint termelő képességű *Escherichia coli* törzs például az *Escherichia coli* W3110(tyrA)/pCABD2 (WO95/16042 számú nemzetközi közzétételi irat) stb. Az *Escherichia coli* W3110(tyrA)/pCABD2 törzset úgy kaptuk, hogy az L-lizin bioszintézisét irányító enzimeket kódoló géneket hordozó pCABD2 plazmidot W3110(tyrA) törzsbe juttattuk, amely egy tyrA-deficiens *Escherichia coli* törzs. A W3110(tyrA) törzs, amelyet AJ12604 törzs nevet kapta, 1991.01.28-án, FERM P-11975 nyilvántartási számon lett letétbe helyezve a „National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry”) (jelenleg: független igazgatási testület; „National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary”) gyűjteményében (Chuo Dai-6, 1-1 Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japán, 305-5466), majd a budapesti egyezménnyel összhangban, 1987.10.29-én FERM BP-3579 nyilvántartási számon nemzetközi gyűjteménybe lett áthelyezve.

A pCABD2 plazmid mutáns dihidrodipikolinát-szintetázt kódoló gént hordoz, amelyben a 118. hisztidin tirozin aminosavval van helyettesítve, és amelyben a gén „feedback” gátlhatósága L-lizinnel megszűnt; ezen felül, a plazmid mutáns aszpartokináz-III-gént tartalmaz, amelyben a 352. pozícióban található treonin aminosav izoleucinnal van helyettesítve, és



amelyben a gén „feedback” gátolhatósága L-lizinnel megszűnt; az említetteken felül, a plazmid dihidrodipikolinát-reduktáz és diaminopimelát-dehidrogenáz géneket hordoz.

A W3110(tyrA) törzset a következőképp kaphatjuk meg. A 488424/1992 számon közreadott európai szabadalmi leírásban számos olyan törzs leírása megtalálható, amelyet úgy kaptak, hogy a W3110(tyrA) törzsbe valamilyen plazmidot juttattak. Például a pHATerm plazmid fenti törzsbe történő bejuttatásával kapott törzset *E. coli* W3110(tyrA)/pHATerm törzsnek nevezték, és FERM BP-3653 nyilvántartási számon letétbe helyezték a „National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (jelenleg: független igazgatási testület; „National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary”) gyűjteményében. A W3110(tyrA) törzset megkaphatjuk például úgy, hogy a pHATerm plazmidot eltávolítjuk a W3110(tyrA)/pHATerm törzsből.

Serratia nemzetséghez tartozó L-lizint termelő baktériumok például L-lizinnel történő „feedback” gátlást megszüntető mutációt hordozó dihidropikolinát-szintetázt kódoló DNS-sel transzformált *Serratia* baktériumok, valamint az olyan aszpartokináz gént tartalmazó *Serratia* baktériumok, amelynek „feedback” gátolhatósága L-lizinnel megszűnt (WO96/41871).

L-arginin termelésére képes coryneform baktériumok például a vad-típusú coryneform baktériumtörzsek; bizonyos hatóanyagokra, például szulfaszármazékokra, 2-tiazol-alaninra, α -amino- β -hidroxivaleriánsavra stb. rezisztens coryneform baktériumok; a 2-tiazol-alanin-rezisztencián felül L-hisztidinre, L-prolinra, L-treoninra, L-izoleucinra, L-metioninra vagy



L-triptofánra auxotrof coryneform baktériumok (54-44096 számon közzétett japán szabadalmi leírás); ketomalonsavra, fluoromalonsavra vagy monofluorecetsavra rezisztens coryneform baktériumok (57-18989 számon közzétett japán szabadalmi leírás); argininolra rezisztens coryneform baktériumok (62-24075 számon közzétett japán szabadalmi leírás); X-guanidinre rezisztens coryneform baktériumok (ahol X jelentése zsírsavszármazék vagy alifás lánc; lásd a 2-186995 számon közzétett japán szabadalmi leírást); stb.

Közelebbről, megemlíthetők a felsorolt törzsek:

Brevibacterium flavum AJ11169 (FERM-BP-6892);

Corynebacterium glutamicum AJ12092 (FERM-BP-6906);

Brevibacterium flavum AJ11336 (FERM-BP-6893);

Brevibacterium flavum AJ11345 (FERM-BP-6894); és

Brevibacterium lactofermentum AJ12430 (FERM-BP-2228).

Az AJ11169 és AJ12092 törzsek az 54-44 096 számon közreadott japán szabadalmi leírásban említett 2-tiazolalanin-rezisztens törzsek; az AJ11336 törzs a 62-24075 számon közreadott japán szabadalmi leírásban említett argininol- és szulfadiazin-rezisztens törzs; az AJ11345 törzs a 62-24075 számon közreadott japán szabadalmi leírásban említett argininol-, 2-tiazolalanin- és szulfadiazin-rezisztens, hisztidin-auxotrof törzs; és az AJ12430 törzs a 2-186 995 számon közreadott japán szabadalmi leírásban említett oktilguanidin-rezisztens és 2-tiazolalanin-rezisztens törzs.

L-arginin termelésére képes *Escherichia* baktériumok például az ArgA-génnel transzformált *Escherichia coli* baktériumok (lásd az 57-5693 számon közreadott japán szabadalmi leírásban); és L-arginin termelésére képes, *Serratia* nemzetséghez



tartozó baktériumok például az arginin-metabolizmusra képtelen, arginin-antagonistákra és canavaninre rezisztens, lizinre auxotrof *Serratia marcescens* baktériumok (lásd az 52-8729 számon közreadott japán szabadalmi leírásban).

L-hisztidin termelésre képes coryneform baktériumok például a *Brevibacterium* nemzetséghez tartozó, tiamin-antagonistákra rezisztens mikroorganizmusok, közelebbről *Brevibacterium lactofermentum* (FERM-P-2170, FERM P-2316, FERM P-6478, FERM P-6479, FERM P-6480 és FERM P-6481 (lásd az 59-63194 számon közreadott japán szabadalmi leírásban). Megemlítendőek továbbá a *Brevibacterium* vagy *Corynebacterium* nemzetséghez tartozó, poliketid-rezisztens és L-hisztidin termelésére képes mutáns törzsek, közelebbről, a FERM P-4161, FERM P-7273, FERM P-8371, FERM P-8372 és ATCC 14067 nyilvántartási számú törzsek.

L-hisztidin termelésre képes, *Escherichia* nemzetséghez tartozó baktériumok például az *Escherichia* nemzetséghez tartozó, hisztidinanalógokra rezisztens mutáns baktériumok, például az *Escherichia coli* R-344-törzs, valamint az *Escherichia* nemzetséghez tartozó, az említett törzsből nyert, L-hisztidin szintézist irányító enzimet kódoló génnel transzformált baktériumok. Közelebbről, például a következő törzsek: *Escherichia coli* NRRL-12116, NRRL-12118, NRRL-12119, NRRL-12120 és NRRL-12121 (lásd az 56-5099 számon közreadott japán szabadalmi leírásban).

L-hisztidin termelésre képes, *Bacillus* nemzetséghez tartozó baktériumok például a *Bacillus* nemzetséghez tartozó, hisztidinanalógokra rezisztens mutáns baktériumok, valamint a *Bacillus* nemzetséghez tartozó, az említett mutáns törzsből



nyert, L-hisztidinantagonista-rezisztenciában szerepet játszó génnel transzformált baktériumok. Megemlítendőek a FERM BP-218, FERM BP-224 és FERM BP-219 nyilvántartási számú törzsek (58-107192 számon közzétett japán szabadalmi leírás).

A találmány szerinti megoldással összhangban, bázikus aminosav termelésére képes mikroorganizmust tenyésztünk folyékony tápközegben, aerob körülmények mellett, például az alább ismertetettek szerint eljárva úgy, hogy karbonátiont és/vagy hidrogénkarbonát-iont alkalmazunk a bázikus aminosav fő ellenanionjaként.

A tápközeg pH-ját 6,5 és 9,0 közt tartjuk; előnyösen, a pH-t a tenyésztés során 6,5 és 8,0 közt, a tenyésztés végén pedig 7,2 és 9,0 közt tartjuk. Ezen felül, a tenyésztés során olyan tenyésztési időszakot biztosítunk, amikor 2 g/l vagy több hidrogénkarbonát-ion és/vagy karbonátion van jelen a tápközegben úgy, hogy a fermentációs tartályban uralkodó nyomás szabályozásával a fermentáció során pozitív nyomást hozunk létre a tartályban, vagy széndioxidgázt vagy széndioxidgázt tartalmazó kevert gázt juttatunk a tápközegbe. „Olyan tenyésztési időszak biztosítása, amikor 2 g/l vagy több hidrogénkarbonát-ion és/vagy karbonátion van jelen a tápközegben”, nem feltétlenül jelenti azt, hogy az ionoknak a tenyésztés teljes ideje alatt 2 g/l koncentrációban vagy azt meghaladó mennyiségben kell jelen lenniük. A kifejezésen azt értjük, hogy elegendő, ha az ionok a tenyésztés egy része alatt 2 g/l mennyiségben vagy azt meghaladó mennyiségben vannak jelen. Előnyösen, az ionok a logaritmikus fázistól a stationer fázisig vannak 2 g/l vagy azt meghaladó mennyiségben jelen.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint, a pH



szabályozott növelése az egyensúlyt olyan helyzetből, ahol a monovalens HCO_3^- -anion domináns, olyan egyensúlyi helyzetbe tolja el, ahol az ellenanionként sokkal hatékonyabb CO_3^{2-} divalens kation válik dominánssá. Amennyiben a pH-t ammóniával szabályozzuk, a pH növelése ammóniát szolgáltat, amely a bázikus aminosav nitrogénforrásává válhat. A bázikus aminosavakon felül, kationokként jelen lehetnek a tápközeg komponenseiből származó K, Na, Mg, Ca stb. kationok. Ezek a kationok a teljes kationtartalomnak legfeljebb 50%-át teszik ki.

Ahhoz, hogy a fermentációs tartályban pozitív nyomást hozzunk létre, alkalmazhatunk például a kiáramló gáznál magasabb nyomású beáramló gázt. Azáltal, hogy a fermentációs tartályban pozitív nyomást hozunk létre, a fermentáció során keletkező széndioxidgáz a tenyésztő tápközegben oldódik, így hidrogénkarbonát-ionok vagy karbonát-ionok jönnek létre, amelyek a bázikus aminosav ellenanionjaiként funkcionálhatnak. Közelebbről, a fermentációs tartályban 0,03-0,2 MPa, előnyösen 0,05-0,15 MPa nyomást hozunk létre. Ezen felül, széndioxidgázt oldhatunk a tenyésztő tápközegben úgy is, hogy széndioxidgázt vagy széndioxidgázt tartalmazó kevert gázt juttatunk a tápközegbe. A már említetteken felül eljárhatunk úgy is, hogy a fermentációs tartályban pozitív nyomást hozunk létre, miközben széndioxidgázt, vagy pedig széndioxidgázt tartalmazó kevert gázt juttatunk a tápközegbe.

A fermentációs tartályban pozitív nyomást tarthatunk fenn úgy, hogy a bemenő gáz nyomását a kimenő gáz nyomását meghaladó szinten tartjuk. Amennyiben széndioxidgázt juttatunk a tenyésztő tápközegbe, azt tiszta széndioxidgázzal vagy 5% vagy több széndioxidgázt tartalmazó gázkeverékkel buborékoltathat-

juk át.

A tenyészethez alkalmazott folyékony tápközeg milyensége közelebbről nincs meghatározva, az adott mikroorganizmustól függően bármely szokásos ismert tápközeget alkalmazhatunk, amely szerves és szervetlen tápanyagforrásokat, például szénforrást, nitrogénforrást és nyomokban más tápanyagokat tartalmaz. Bármely szénforrás alkalmazható, amennyiben a mikroorganizmus képes azt felhasználni. Alkalmazhatunk például cukrokat, mint például szacharózt, glükózt, fruktózt, melaszt és keményítőhidrolizátumot; szerves savakat, például ecetsavat; alkoholokat, például etanolt stb. Nitrogénforrásként alkalmazhatunk például szervetlen vegyületeket, például ammónium-ionokat, valamint proteinhidrolizátumot, élesztőkivonatot stb. Nyomokban jelenlévő tápanyagokként megemlítendő az aminosavak, vitaminok, nyomokban jelenlévő fémek stb.

A fermentációs eljárás menete sincs közelebbről meghatározva, végezhetjük szakaszos üzemmódú tenyészetben, ahol friss tápközeget nem juttatunk a rendszerbe; adagolós üzemmódú tenyészetben, ahol a kezdetben hozzáadott cukor fogyásával friss tápközeget juttatunk a tenyészetbe; vagy folyamatos üzemmódú tenyészetben, ahol a tápközeget extraháljuk, amikor a tápközeg térfogata túllépi a fermentációs tartály számára megfelelő térfogatot.

A tenyészet hőmérsékletét az adott mikroorganizmusnak megfelelően választjuk meg, ami általában 25-45 °C, előnyösen 30-40 °C. Ezen felül, a tenyészetet megfelelőképp keverjük, és elegendő oxigénnel látjuk el a fermentáció során.

A technika állása szerint ismert eljárásokban, elegendő mennyiségű ammónium-szulfátot, ammónium-kloridot, vagy kénsa-

vas vagy sósavas kezeléssel nyert proteinlebomlási terméket adunk a tápközeghez a keletkező bázikus aminosav ellenanion-jaiként, miáltal a tápközeg a fenti vegyületekből származó szulfátionokat és kloridionokat tartalmaz. Ezért a gyenge aciditást mutató karbonátionok koncentrációja a tenyésztés során rendkívül alacsony, és csak pikomol/l (pmol/l) nagyságrendben mutatható ki. A találmány szerinti eljárásban a szulfátionok és kloridionok koncentrációját csökkentjük, és a mikroorganizmusból a fermentáció során a fermentációs térbe felszabaduló széndioxidgázt nyeletünk el a tápközegben ellenanion-forrásként. A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint tehát nem kell szulfátionokat vagy kloridionokat adnunk a tápközeghez a mikroorganizmusok növekedéséhez szükséges szintet meghaladó mennyiségben. Előnyösen, megfelelő mennyiségű ammónium-szulfátot vagy hasonló vegyületet adunk a tápközeghez a tenyésztés korai szakaszában, majd az utánpótlást a tenyésztés során leállítjuk. Eljárhatunk úgy is, hogy ammónium-szulfátot vagy hasonló vegyületet adunk a tápközeghez, miközben azok mennyiségét a tápközegben jelenlévő karbonátionok vagy hidrogénkarbonát-ionok mennyiségével megfelelő egyensúlyban tartjuk. Az említetteken felül, ammóniát adhatunk a tápközeghez L-lizin nitrogénforrásaként.

Szokásosan, amennyiben ammónium-szulfátot adunk a tápközeghez bázikus aminosav ellenanion-forrásaként, a tápközegben található széndioxidgáz a szulfátionok jelenléte következtében felszabadul. Ezzel szemben, a találmány szerinti megoldással összhangban - mivel nem kell feleslegben ammónium-szulfátot adnunk a tápközeghez - a széndioxidgáz könnyen feloldódik a fermentációs közegben.



A találmány szerinti eljárással nyert bázikus aminosavat tartalmazó fermentációs tápközeg karbonátionokat vagy hidrogénkarbonát-ionokat tartalmaz a fermentációval előállított bázikus aminosav normálkoncentrációjához viszonyítva 5-80% koncentrációban. Ezek a karbonátionok vagy hidrogénkarbonát-ionok melegítésre széndioxidgázként szabadulnak fel. Ezáltal a fermentációs tápközeg szilárd komponenseinek bázikus aminosav-tartalma növelhető. Ezen felül, amennyiben szénsavnál erősebb savat adunk a fermentációs tápközeghez, az könnyen helyettesíti a szénsavat, ezáltal különböző típusú sók hozhatók létre. A leírás szerinti értelemben „fermentációs terméken” értünk a fenti fermentációs tápközegből nyert koncentrált és szárított termékeket, magát a fermentációs tápközeget és annak szárított formáját.

A bázikus aminosav a fermentációs tápközegből ismert technológiák kombinációjával, például ioncserélő kromatográfiával, precipitációs eljárásokkal és más technológiákkal nyerhető ki.

Miután a találmány szerinti megoldást általánosságban ismertettük, a továbbiakban azt a pontosabb értelmezhetőség céljából konkrét megvalósítási példákon keresztül kívánjuk szemléltetni, anélkül azonban, hogy igényünket az ismertetettekre korlátoznánk.

1. példa

(1) L-lizint termelő baktérium oltótenyésztésének előállítása

300 ml térfogatú, 45 g/l glükóz, 15 g/l molassz, 2 g/l szójabrotein-hidrolizátum (nitrogénforrásként), 2 g/l KH_2PO_4 , 5,6 g/l NaOH, 1 g/l ammónium-szulfát, 0,8 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 20 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 20 mg/l $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0,8 mg/l tiamin-hidro-



klorid és 0,2 mg/l biotin összetételű (pH=6,0) tápközeget mértünk 1 liter térfogatú, kisméretű, üvegből készült fermentációs tartályba, és azt 120 °C-on, 20 percig hőkezeléssel sterilizáltuk. Ezután a fermentációs tartályt 31,5 °C-ra lehűtöttük, és 5 platinakacsnyi, előzőleg 24 óráig LB-lemezen szaporított *Brevibacterium lacofermentum* törzzsel beoltottuk, majd 30 órán át, 31,5 °C-on, 7,0-es pH-nál, megfelelő levegőztetés és keverés mellett tenyésztettük.

(2) Törzstenyészet előállítása

300 ml térfogatú, 30 g/l glükóz, 45 g/l molassz, 2 g/l szójabrotein-hidrolizátum (nitrogénforrásként), 1,4 g/l foszfor-sav, 1 g/l NaOH, 30 g/l ammónium-szulfát, 1,5 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 15 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 15 mg/l $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 5 mg/l tiamin-hidroklorid és 0,75 mg/l biotin összetételű (pH=5,0) tápközeget mértünk 1 liter térfogatú, kisméretű, üvegből készült fermentációs tartályba, és 120 °C-on, 20 percig hőkezeléssel sterilizáltuk. Ezután a fermentációs tartályt 31,5 °C-ra lehűtöttük, a fenti oltótenyészet 45 ml térfogatú mintájával beoltottuk, majd 34 °C-on, $\frac{1}{2}$ vvm levegőztetés és megfelelő keverés mellett tenyésztettük.

Amikor a tenyésztő tápközeg cukorkoncentrációja 5 g/l értékre vagy az alá süllyedt, a következő komponenseket tartalmazó tápközeget juttattunk a rendszerbe az 5 30985 számon közölt japán szabadalmi leírásban ismertetettek szerint. Közlebről: mértük a pH-t és az oldott oxigén koncentrációját, a fenti paraméterek változása alapján következtettünk a rendelkezésre álló szénforrás mennyiségének csökkenésére, és a tápközegbe olyan elegyet adagoltunk, hogy a szénforrás koncentrációját a tenyésztő tápközegben 5 g/l vagy az alatti értéken



tartsuk (kiegészítő tápközeg).

A kiegészítő tápközeg összetétele a következő volt: 530 g/l glükóz, 1,4 g/l szójabrotein-hidrolizátum (nitrogénforrásként), 1,0 g/l KOH, 44 g/l ammónium-klorid, 0,3 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,35 mg/l tiamin-hidroklorid és 0,35 mg/l biotin (pH=5,5).

Miután a tartályba meghatározott mennyiségű kiegészítő tápközeget juttattunk, és a tenyésztő tápközegben a cukrok teljesen felhasználódtak, a tenyésztést befejeztük. A tenyésztést 7,0-es pH-értéken kezdtük el, majd a pH-t fokozatosan 8,0-ra emeltük, ezzel párhuzamosan, a tartályban uralkodó nyomást 0 MPa-ról 0,12 MPa-ra növeltük.

Az 1. összehasonlító példában a pH és a tartályban uralkodó nyomás növelése helyett ammónium-szulfátot adtunk a rendszerhez.

A tenyésztés során az anionkoncentrációkban megfigyelhető fő változásokat az 1. ábrán szemléltetjük. Míg az 1. összehasonlító példában a szulfátionok koncentrációja a tenyésztés során növekedett, az 1. példában ez alacsony volt, és ehelyett a hidrogénkarbonát-ionok koncentrációja emelkedett.

A tenyésztés befejezését követően, a karbonátionok és hidrogénkarbonát-ionok normálkoncentrációjának aránya 33% volt az elsősorban lizinből álló kationokéhoz viszonyítva, amely utóbbi a bázikus aminosavat képviselte a fermentációs tartályban. Ezenfelül a fermentációs tápközegből nyert teljes szárított termék L-lizin-tartalma 46%-nak bizonyult. Másrészt az 1. összehasonlító példában a karbonátionok és hidrogénkarbonát-ionok normálkoncentrációjának aránya 0% volt az elsősorban lizinből álló kationokéhoz viszonyítva, és a szulfátionok és



kloridionok voltak túlsúlyban. Ebben az esetben, a fermentációs tápközegből nyert teljes szárított termék L-lizin-tartalma 43%-nak bizonyult.

2. példa

(1) L-lizint termelő baktérium oltótenyészetének előállítása

300 ml térfogatú, 40 g/l glükóz, 0,6 g/l szójabrotein-hidrolizátum (nitrogénforrásként), 1 g/l KH_2PO_4 , 5,6 g/l NaOH, 8 g/l ammónium-szulfát, 1,0 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/l $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (pH=6,0) összetételű tápközeget mértünk be egy 1 liter térfogatú, kisméretű, üvegből készült fermentációs tartályba, és 120 °C-on, 20 percig hőkezeléssel sterilizáltuk. Ezután a fermentációs tartályt 37 °C-ra lehűtöttük, 5 platina-kacsnyi, előzőleg 24 óráig LB-lemezen szaporított *Escherichia coli* W3110(tyrA)/pCABD2 törzzsel beoltottuk (lásd a WO95/16 042 számú nemzetközi közzétételi iratot), majd 30 órán át, 31,5 °C-on, 7,0-es pH-nál, megfelelő levegőztetés és keverés mellett tenyésztettük.

(2) Törzstenyészet előállítása

300 ml térfogatú, 30 g/l glükóz, 0,4 g/l szójabrotein-hidrolizátum (nitrogénforrásként), 0,5 g/l KH_2PO_4 , 20 g/l ammónium-szulfát, 1,0 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 30 mg/l $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 30 mg/l $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (pH=5,0) tápközeget bemértünk egy 1 liter térfogatú, kisméretű, üvegből készült fermentációs tartályba, és 120 °C-on, 20 percig hőkezeléssel sterilizáltuk. Ezután a fermentációs tartályt 37 °C-ra lehűtöttük, a fenti oltótenyészet 50 ml térfogatú mintájával beoltottuk, majd 37 °C-on, ½ vvm levegőztetés és megfelelő keverés mellett tenyésztettük.

Amikor a tenyésztő tápközeg cukorkoncentrációja 5 g/l értékre vagy az alá süllyedt, 760 g/l glükózt tartalmazó oldatot



juttattunk a rendszerbe az 5 30985 számon közzétett japán szabadalmi leírásban ismertettek szerint, az 1. példában ismertett módon.

Miután a tartályba meghatározott mennyiségű kiegészítő tápközeget juttattunk, és a tenyésztő tápközegeben a cukrok teljesen felhasználódtak, a tenyésztést befejeztük. A tenyésztést 6,7-es pH-értéken kezdtük el, majd a pH-t fokozatosan 8,0-ra emeltük, ezzel párhuzamosan a tartályban uralkodó nyomást 0 MPa-ról 0,1 MPa-ra növeltük.

A 2. összehasonlító példában a pH és a tartályban uralkodó nyomás növelése helyett ammónium-szulfátot adtunk a rendszerhez.

A tenyésztés során az anionkoncentrációkban megfigyelhető fő változásokat a 2. ábrán szemléltetjük. Míg a 2. összehasonlító példában a szulfátionok koncentrációja a tenyésztés során növekedett, a 2. példában annak koncentrációja alacsony volt, és ehelyett a hidrogénkarbonát-ionok koncentrációja emelkedett.

A tenyésztés befejezését követően a karbonátionok és hidrogénkarbonát-ionok normálkoncentrációjának aránya 25% volt az elsősorban lizinből álló kationokéhoz viszonyítva, amely utóbbi a bázikus aminosavat képviselte a fermentációs tartályban. Ezen felül a fermentációs tápközegből nyert teljes szárított termék L-lizin-tartalma 64%-nak bizonyult. Másrészt a 2. összehasonlító példában a karbonátionok és hidrogénkarbonát-ionok normálkoncentrációjának aránya 0% volt az elsősorban lizinből álló kationokéhoz viszonyítva, és a szulfátionok és kloridionok voltak túlsúlyban. Ebben az esetben, a fermentációs tápközegből nyert teljes szárított termék L-lizin-tartalma



61%-nak bizonyult.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás bázikus aminosav vagy a bázikus aminosavat tartalmazó fermentációs tápközeg vagy fermentációs termék előállítására fermentációval, azzal jellemezve, hogy a bázikus aminosav termelésére képes mikroorganizmust tenyésztünk folyékony tápközegben, aerob körülmények mellett úgy, hogy a bázikus aminosav a tápközegben termelődjék és abban felhalmozódjék; ahol:

a tápközeg pH-értékét a tenyésztés során 6,5 és 9,0 közt, a tenyésztés végén pedig 7,2 és 9,0 közt tartjuk; és

a tenyésztés során olyan tenyésztési időszakot biztosítunk, amelyben 2 g/l vagy több hidrogénkarbonát-ion és/vagy karbonátion van jelen a tápközegben úgy, hogy a fermentáció során pozitív nyomást hozunk létre a nyomás szabályozásával a fermentációs tartályban, vagy pedig széndioxidgázt vagy széndioxidgázt tartalmazó kevert gázt juttatunk a tápközegbe, miáltal a keletkező hidrogénkarbonát-ionok és/vagy karbonátionok ellenanionokként funkcionálhatnak az elsősorban a bázikus aminosavból álló kationok számára.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás bázikus aminosav vagy a bázikus aminosavat tartalmazó fermentációs tápközeg vagy fermentációs termék előállítására, azzal jellemezve, hogy a fermentációs tartályban 0,03-0,2 MPa nyomást hozunk létre.



3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás bázikus aminosav vagy a bázikus aminosavat tartalmazó fermentációs tápközeg vagy fermentációs termék előállítására, azzal jellemezve, hogy bázikus aminosavként L-lizint, L-arginint és/vagy L-hisztidint állítunk elő.

4. Bázikus aminosavat tartalmazó fermentációs tápközeg, amely folyékony tápközegekben, aerob körülmények mellett a bázikus aminosav termelésére képes mikroorganizmus tenyésztésével van előállítva; vagy fermentációs tápközegből előállított fermentációs termék, amely hidrogénkarbonát-ionokat és/vagy karbonátionokat tartalmaz az elsősorban a bázikus aminosavakból álló kationok ellenanionjaiként, ahol a normálkoncentrációk aránya 5-80% az alábbi képlet alapján:

normálkoncentrációk aránya = [hidrogénkarbonát-ionok és/vagy karbonát-ionok normálkoncentrációja]/[az elsősorban a bázikus aminosavakból álló kationok normálkoncentrációja]x100.

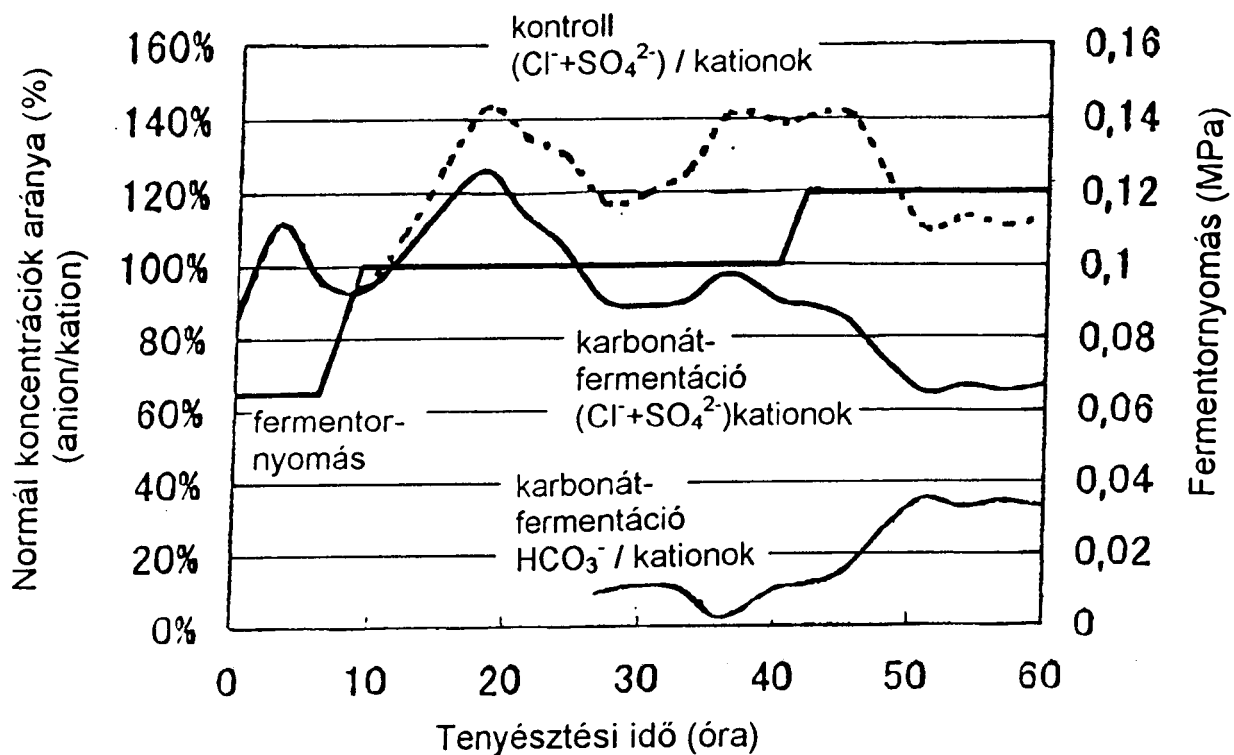
5. A 4. igénypont szerinti bázikus aminosavat tartalmazó fermentációs tápközeg vagy fermentációs termék, amely bázikus aminosavként L-lizint, L-arginint és/vagy L-hisztidint tartalmaz.

6. Bázikus aminosavat tartalmazó fermentációs tápközeg vagy fermentációs termék, amelyet úgy állítunk elő, hogy a 4. igénypont szerinti, bázikus aminosavat tartalmazó fermentációs tápközeget vagy fermentációs terméket hagyjuk széndioxid-gázt kibocsátani.

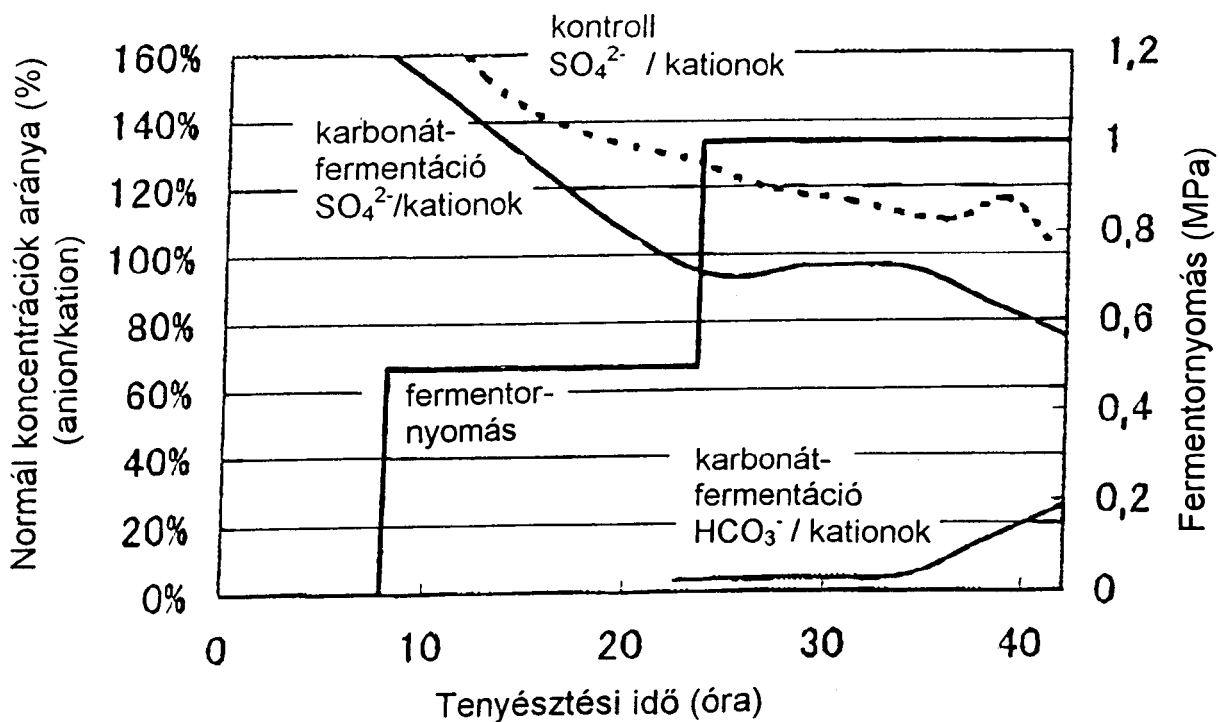
A meghatalmazott:

23 oldal
1 a' l' e' s a' l' a' l'
24 oldal
Zemán

DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft
Dr. Gárdonyi Zoltánné
szabadalmi ügyvivő
[Signature]



1. ábra



2. ábra