POLSKA RZECZPOSPOLITA LUDOWA

URZĄD PATENTOWY PRL

OPIS PATENTOWY 106 106

Patent dodatkowy do patentu nr ————

Zgłoszono: 27.04.77 (P. 197720)

Pierwszeństwo ————

Zgłoszenie ogłoszono: 20.11.78

Opis patentowy opublikowano: **30.04.1980**

Int. Cl.[2] **C12D 13/06**

Twórcy wynalazku: Danuta Kotiuszko, Halina Morawska, Marian Tyc, Halina Matylewicz, Paulina Szechner

Uprawniony z patentu: Instytut Przemysłu Farmaceutycznego, Warszawa (Polska)

Sposób wytwarzania L-lizyny

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania L-lizyny metodą mikrobiologiczną przy użyciu mutantów poliauksotroficznych drobnoustroju Brevibacterium flavum.

Znany jest szereg sposobów wytwarzania L-lizyny przy użyciu różnych typów mutantów biochemicznych drobnoustrojów z rodzaju Brevibacterium, jak również z rodzaju Corynebacterium, Arthrobacter, Microeoccus.

Dotychczas najwyższe wydajności procesu biosyntezy, rzędu 50—58 g chlorowodorku L-lizyny/litr uzyskiwano przy zastosowaniu mutantów Brevibacterium lactofermentum, opornych na działanie analogów L-lizyny i jednocześnie niezdolnych do biosyntezy niektórych aminokwasów lub witamin (opis patentowy belgijski nr 798 890 oraz opis patentowy francuski nr 2 230 723). Ponadto, dla uzyskania wysokich wydajności, jak podano we wspomnianych opisach patentowych, stosowano drogie składniki pożywek hodowlanych, takie jak: czyste cukry proste, aminokwasy i witaminy oraz dodatkowo antybiotyki, przeciwutleniacze i środki powierzchniowo czynne.

W opisie patentowym polskim nr 94 291 opisano sposób wytwarzania chlorowodorku L-lizyny z wydajnością 40 g/l przy użyciu mutanta auksotroficznego Micrococcus glutamicus i pożywek, zawierających produkt odpadowy przemysłu ziemniaczanego.

W sposobie według wynalazku do wytwarzania L-lizyny metodą mikrobiologiczną zastosowano nowe wysokowydajne mutanty poliauksotroficzne Brevibacterium flavum, uzyskując w zależności od użytego mutanta i składników pożywki, wydajności rzędu 50—70 g chlorowodorku L-lizyny/litr, przy równoczesnym wykorzystaniu jako

2

składników pożywki tanich, pośrednich i/lub odpadowych produktów przemysłu rolno-spożywczego.

Mutanty poliauksotroficzne o nieopisanych dotychczas właściwościach, otrzymano ze szczepu prototroficznego Brevibacterium flavum ATCC 14067 drogą kolejnych mutacji i selekcji, prowadzonych znanymi metodami (Lederberg J.:, Isolation and characterization of biochemical mutants of bacteria", Methods in Medical Research, 1950).

Najkorzystniejszymi dla wytwarzania L-lizyny w sposobie według wynalazku są otrzymane mutanty Brevibacterium flavum o typach poliauksotrofii przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1

Mutant	Typ poliauksotrofii: substancje konieczne do wzrostu	Cechy dodatkowe (*)
1	2	3
Brevibacterium flavum IPF 2105	biotyna, treonina arginina	nie rośnie przy wyższych stężeniach treoniny
Brevibacterium flavum IPF 2110	biotyna, treonina izoleucyna lub biotyna, treonina pirydoksal lub	nie rośnie przy wyższych stężeniach treoniny

c.d. tabeli 1

1	2	3
	biotyna, treonina pirydoksyna	
Brevibacterium flavum IPF 2146	biotyna, treonina izoleucyna lub biotyna, treonina pirydoksal lub biotyna, treonina pirydoksyna	nie rośnie przy wyższych stężeniach treoniny

*) hamujące wzrost działanie wyższych stężeń treoniny (powyżej 10 mikrogramów w 1 ml) znoszone jest przez znajdującą się w składnikach pożywki metioninę.

Mutanty poliauksotroficzne Brevibacterium flavum IPF 2105, Brevibacterium flavum IPF 2110, Brevibacterium flavum IPF 2146 przechowywane są w Muzeum Szczepów Instytutu Przemysłu Farmaceutycznego.

Proces biosyntezy L-lizyny przy użyciu wysokowydajnych mutantów poliauksotroficznych Brevibacterium flavum sposobem według wynalazku prowadzi się w warunkach tlenowych, w temperaturze 28—32 °C na pożywkach płynnych, zawierających jako źródło węgla rozpuszczalne węglowodany np. glukozę techniczną, cukier spożywczy, cukier surowy, melasę, hydrolizat szlamu krochmalowego i inne lub ich mieszaniny.

Jako źródło węgla stosuje się również alkohole np. etanol, propanol oraz kwasy organiczne i ich sole, np. kwas octowy i/lub octan amonu i/lub octan sodu i/lub octan wapnia. Jako źródło azotu niebiałkowego stosuje się mocznik, sole amonowe, jak np. siarczan amonu, chlorek amonu i/lub wodorotlenek amonu. Do pożywek wprowadza się również źródło azotu aminokwasowego w postaci odbiałczonego soku komórkowego ziemniaka, wyciągu namokowego kukurydzy, hydrolizatu śruty rzepakowej, hydrolizatu odtłuszczonej mąki arachidowej lub ich mieszanin. Korzystne jest stosowanie również substancji buforujących, jak np. węglanu wapnia i soli kwasu fosforowego. Odczyn hodowli w czasie procesu biosyntezy L-lizyny utrzymuje się w granicach pH=6,0—8,0, dodając roztworu mocznika i/lub wodorotlenku amonu.

Dalsze szczegóły sposobu według wynalazku znajdują się w przykładach, które służą do objaśnienia, nie ograniczając wynalazku.

Przykład I. Hodowlę na pożywce stałej mutanta poliauksotroficznego Brevibacterium flavum IPF 2146 prowadzono na skosie agarowym o następującym składzie: Pepton-Protease Difco — 1,0%, NaCl — 0,5%, wyciąg wołowy Difco — 0,22%, glukoza — 1,0%, agar — 2,0%, woda destylowana do 100%. Przed sterylizacją korygowano pH do wartości 7,4. Sterylizację pożywki agarowej prowadzono w temperaturze 117 °C przez 30 minut. Agary skośne szczepiono komórkami mutanta pobranymi oczkiem czy z 48-godzinnej hodowli na agarach skośnych o tym samym składzie, przechowywanej w chłodni w temperaturze +4 °C w ciągu najwyżej miesiąca. Zaszczepione agary skośne umieszczano w termostacie o temperaturze 28 °C na 48 godzin. Komórki mutanta zmywano z hodowli agarowej 2 mol 0,85% roztworu NaCl w wodzie lub 2 ml bulionu. Otrzymaną zawiesiną komórek szczepiono pożywkę posiewową w kolbach.

Hodowlę posiewową mutanta poliauksotroficznego Brevibacterium flavum IPF 2146 prowadzono w kolbach stożkowych o objętości 500 ml, zawierających po 50 ml pożywki posiewowej o następującym składzie: melasa (około 50% cukrów redukujących) — 4,0%, wyciąg namokowy kukurydzy (50% suchej masy) — 1,0%, $(NH_4)_2SO_4$ techniczny 1,5%, drożdże suszone pastewne — 0,25%, $CaCO_3$ techniczny — 0,5%, woda wodociągowa do 100%. Przed sterylizacją korygowano pH do wartości 7,2. Sterylizację prowadzono w temperaturze 117 °C przez 30 minut. Tak przygotowaną pożywkę posiewową szczepiono zawiesiną komórek z hodowli na pożywce stałej, w ilości 0,2 ml zawiesiny na 50 ml pożywki. Hodowlę posiewową prowadzono przez 16—24 godziny na trzęsawce obrotowej o 220 obrotach /minutę, umieszczonej w termostacie w temperaturze 30 °C.

Hodowlę produkcyjną mutanta poliauksotroficznego Brevibacterium flavum IPF 2146 prowadzono w kolbach stożkowych o pojemności 500 ml z łamaczem, zawierających 30 ml pożywki, o następującym składzie: $CaCO_3$ techniczny — 2,0%, $(NH_4)_2SO_4$ techniczny — 4,0%, melasa buraczana — 15% (w przeliczeniu na cukry redukujące), odbiałczony sok komórkowy ziemniaka — do 100%. Melasę buraczaną i roztwór pozostałych składników pożywki sterylizowano oddzielnie w temperaturze 117 °C przez 30 minut. Po sterylizacji roztwór składników pożywki uzupełniano melasą. Wartość pH tak przygotowanej pożywki wynosiła 7,3—7,5. Pożywkę szczepiono hodowlą posiewową w ilości 5% objętościowych. Hodowlę produkcyjną prowadzono 96 godzin na trzęsawce obrotowej o 220 obrotach/minutę, umieszczonej w termostacie o temperaturze 30 °C. W czasie procesu biosyntezy utrzymywano pH w granicach 6,0—8,0 dodatkiem 10%-ego roztworu wodnego mocznika. Po zakończeniu procesu biosyntezy litr brzeczki zawierał 52,0 g L-lizyny HCl.

Przykład II. Hodowlę mutanta poliauksotroficznego Brevibacterium flavum IPF 2146 na pożywce stałej i pożywce posiewowej prowadzono jak w przykładzie I.

Hodowlę produkcyjną mutanta prowadzono w kolbach stożkowych o pojemności 500 ml z łamaczem, zawierających 30 ml pożywki o następującym składzie: wyciąg namokowy kukurydzy (50% suchej masy) — 4,0%, $CaCO_3$ techniczny —2,0%, $(NH_4)_2SO_4$ techniczny — 4,0%, $MgSO_4$ — 0,02%, K_2HPO_4 — 0,1%, melasa buraczana — 15% lub mieszanina malasy buraczanej — 5% i hydrolizatu szlamu krochmalowego 10% (w przeliczeniu na cukry redukujące), woda wodociągowa do 100%. Melasę buraczaną, hydrolizat szlamu kroch malowego i roztwór pozostałych składników pożywki sterylizowano oddzielnie w temperaturze 117 °C przez 30 minut. Po sterylizacji roztwór składników pożywki uzupełniano melasą lub mieszaniną melasy i hydrolizatu szlamu krochmalowego. Wartość pH tak przygotowanej pożywki wynosiła 7,3—7,5. Pożywkę szczepiono hodowlą posiewową w ilości 5% objętościowych. Hodowlę produkcyjną prowadzono 96 godzin w warunkach, jak w przykładzie I. Po zakończeniu procesu biosyntezy litr brzeczki zawierał L-lizynę w ilości podanej w tabeli 2.

Tabela 2

Źródło węgla *	L-lizyna · HCl w g/l
Melasa buraczana 15%	50,0
Melasa buraczana 5% + hydrolizat szlamu krochmalowego 10%	52,0

x — w przeliczeniu na cukry redukujące.

Przykład III. Hodowlę mutantów poliauksotroficznych Brevibacterium flavum IPF 2105, B. flavum IPF 2110 oraz B. flavum IPF 2146 na pożywce stałej i pożywce posiewowej prowadzono jak w przykładzie I.

Hodowlę produkcyjną mutantów prowadzono w kolbach stożkowych o pojemności 500 ml z łamaczem, zawierających 30 ml pożywki o następującym składzie: hydrolizat śruty rzepakowej (w przeliczeniu na śrutę) — 4,0%, $CaCO_3$ techniczny — 4,0%, $(NH_4)_2SO_4$ techniczny — 1,0%, $MgSO_4$ — 0,02%, K_2HPO_4 — 0,1%, cukier surowy lub melasa buraczana (w przeliczeniu na cukry redukujące) — 15%, woda wodociągowa do 100%. Roztwór cukru surowego, melasę buraczaną i roztwór pozostałych składników pożywki sterylizowano oddzielnie przez 30 minut w temperaturze 117°C. Po sterylizacji roztwór składników pożywki uzupełniano melasą lub roztworem cukru surowego. Wartość pH pożywki wynosiła 7,3—7,5. Pożywkę produkcyjną szczepiono hodowlą posiewową w ilości 5% objętościowych. Hodowlę produkcyjną prowadzono 96 godzin w warunkach, jak w przykładzie I z tym, że nie korygowano pH w czasie procesu biosyntezy. Po zakończeniu procesu biosyntezy 1 litr brzeczki zawierał L-lizynę w ilości podanej w tabeli 3.

Tabela 3

Mutant	Źródło węgla w pożywce	L-lizyna · HCL w g/l
Brevibacterium flavum IPF 2105	cukier surowy	38,4
	melasa	43,0
Brevibacterium flavum IPF 2110	cukier surowy	53,0
	melasa	53,2
Brevibacterium flavum IPF 2146	cukier surowy	62,0
	melasa	55,0

Przykład IV. Prowadzono hodowlę mutantów poliauksotroficznych Brevibacterium flavum IPF 2105, Brevibacterium flavum IPF 2110 oraz Brevibacterium flavum IPF 2146 na pożywce stałej i pożywce posiewowej, jak w przykładzie I.

Hodowlę produkcyjną mutantów prowadzono w kolbach stożkowych o pojemności 500 ml z łamaczem, zawierających 30 ml pożywki i następującym składzie: hydrolizat mąki arachidowej (w przeliczeniu na mąkę) — 4,0%, $CaCO_3$ techniczny — 2,0%, $MgSO_4$ — 0,02%, K_2HPO_4 — — 0,1%, cukier surowy (w przeliczeniu na cukry redukujące) — 15%, woda wodociągowa do 100%. Roztwór cukru surowego i roztwór pozostałych składników pożywki sterylizowano oddzielnie przez 30 minut w temperaturze 117°C. Po sterylizacji roztwór składników pożywki uzupełniano roztworem cukru surowego. Wartość pH pożywki wynosiła 7,3—7,5. Pożywkę szczepiono hodowlą posiewową w ilości 5% objętościowych. Hodowlę prowadzono 72—96 godzin w warunkach, jak w przykładzie I. Po zakończeniu procesu biosyntezy 1 litr brzeczki zawierał lizynę w ilości podanej w tabeli 4.

Tabela 4

Mutant	L-lizyna · HCl w g/litr	
	w 72 godz.	w 96 godz.
Brevibacterium flavum IPF 2105	55,0	58,2
Brevibacterium flavum IPF 2110	53,5	64,6
Brevibacterium flavum IPF 2146	58,9	70,4

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania L-lizyny metodą mikrobiologiczną przy użyciu mutantów biochemicznych drobnoustroju z rodzaju Brevibacterium flavum, **znamienny tym,** że proces biosyntezy prowadzi się przy użyciu poliauksotroficznych mutantów Brevibacterium flavum IPF 2105, IPF 2110, IPF 2146, wymagających dla wzrostu biotyny, treoniny i argininy lub biotyny, treoniny i izoleucyny, równocześnie wrażliwych na treoninę, w warunkach tlenowych, w temperaturze 28°—32°C, w czasie 72—96 godzin, na pożywkach płynnych, zawierających przyswajalne źródła węgla, azotu oraz substancji buforujących, przy wartości pH hodowli 6,0—8,0.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym,** że jako źródło przyswajalnego węgla stosuje się węglowodany, takie jak glukoza techniczna, cukier surowy, melasa buraczara, hydrolizat szlamu krochmalowego lub ich mieszaniny, jako źródło azotu niebiałkowego stosuje się mocznik, sole amonowe oraz, jako źródło azotu aminokwasowego — odbiałczony sok komórkowy ziemniaka, hydrolizat śruty rzepakowej, hydrolizat mąki arachidowej, wyciąg namokowy kukurydzy.