



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

195552

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 13/08

/22/ Přihlášeno 11 11 77
/21/ /PV 7397-77/

(40) Zveřejněno 31 05 79

(45) Vydáno 15 04 82

(75)

Autor vynálezu

SMĚKAL FRANTIŠEK RNDr. CSc., KUČEROVÁ HANA ing.
a ULBERT STANISLAV ing., PRAHA

(54) Způsob fermentační přípravy L-lysinu

1

Vynález se týká způsobu fermentační přípravy L-lysinu kultivací produkčních mikroorganismů, zejména rodů *Corynebacterium* nebo *Brevibacterium*, v tekutých živných půdách, obsahujících zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku a minerální živné soli, za submerzních podmínek. Nejčastějším zdrojem asimilovatelného uhlíku je sacharóza, obvyklými zdroji dusíku jsou amonné soli, zejména anorganické, kukuřičný výluh, hydrolyzát arašidové mouky apod.

V novější době se objevují snahy nahradit sacharózu, které se používá ve značném množství, a která je poměrně drahá a čím dále tím obtížněji dostupná, pokud možno, úplně, nebo alespoň částečně, jinými zdroji uhlíku, které by byly levnější a snáze dostupné, a které by umožňovaly dosažení přijatelných výtěžků lysinu. Je popsána například fermentační příprava lysinu s použitím kyseliny octové a octanu amonného /dále v kombinaci s glukózou, hydrolyzátem škrobu nebo melasou/ jako zdrojů uhlíku /francouzský patentový spis č. 2 033 119/; NSR patentový spis č. 2 100 159 popisuje dávkování směsi kyseliny octové, octanu amonného a glukózy při fermentační přípravě lysinu s produkčními kmeny *Brevibacterium* a *Corynebacterium*. Dále je známa fermentační příprava lysinu se směsí glukózy, kyseliny octové a ethanolu s kmeny *Brevibacterium lactofermentum* a *Corynebacterium acetoacidophilum*. Britský patentový spis č. 1 300 654 uvádí přípravu lysinu s kmenem *Corynebacterium acetophilum* ve fermentačním médiu s kyselinou octovou a amonnými sole-

2

mi a dávkování acetátové směsi v průběhu fermentace.

Cílem vynálezu bylo nalezení takových zdrojů uhlíku, respektive jejich kombinace, které by umožnily maximální úsporu sacharózy při zachování ekonomicky únosné výtěžnosti lysinu. Adaptace použitého kmene na tyto zdroje uhlíku začíná již ve stadiu přípravy inokula, kdy se část sacharózy v médiu nahradí zdrojem jiným. Jako zdrojů dusíku se používá obvyklých surovin, tj. amonných solí, kukuřičného výluhu, hydrolyzátu arašidové mouky apod. Vlastní produkční fáze se zahajuje kultivací na půdě již bez sacharózy, s běžnými zdroji dusíku. Hlavní zdroj uhlíku s částí sacharózy se potom dává v závislosti na hodnotě pH v dalších fázích kultivace.

Způsob fermentační přípravy lysinu s obměněnými zdroji uhlíku a s jejich specifickým dávkováním řeší vynález, jehož podstata spočívá v tom, že se produkční mikroorganismus nejprve namnoží v inokulační půdě obsahující sůl kyseliny octové s alkalickým kovem nebo sůl amonnou v množství 40 až 60 g/litr média a sacharózu v množství 20 až 30 g/litr média a zdroj dusíku, potom se získanou kulturou zaočkuje fermentační půda, určená pro nárůst kultury produkčního mikroorganismu, s hodnotou pH 7 až 8, s výhodou 7,2 až 7,5, obsahující jako jediný zdroj asimilovatelného uhlíku sůl kyseliny octové s alkalickým kovem nebo sůl amonnou v množství 38 až 42 g/litr média, načež se po zahájení fermentace při dosažení hodnoty pH média 7,5 až 8,0 udržuje v dalším prů-

běhu fermentace pH na hodnotě 7,0 až 7,5 dávkováním kombinované směsi zdrojů uhlíku obsahující 90 až 110 hmot. dílů kyseliny octové, 20 až 30 hmot. dílů octanu amonného, 65 až 85 hmot. dílů kyseliny mléčné, 90 až 110 hmot. dílů sacharózy a 140 až 160 hmot. dílů vody, až do ukončení fermentace.

Uvedeným opatřením, snadno realizovatelným i ve výrobním měřítku, se dosáhne podstatné úspory sacharózy při zachování relativně vysokých a standardních výtěžků lysinu.

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

Příklady provedení

P ř í k l a d 1

Kmenem *Corynebacterium glutamicum* se zaočkuje 60 ml inokulačního média v 500 ml varné baňce, tohoto složení

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

Kultivuje se na rotační třepačce /220 obr./min/ při 29 až 30 °C po dobu 24 hodin. Po této době je pH inokula 7,5. Získanou kulturou se v množství 10 % obj. zaočkuje 20 ml fermentačního média, opět v 500 ml varných baňkách, které má toto složení:

octan sodný	40 g
kukuřičný výluh 60%ní	10 g
hydrolyzát arašidové mouky	150 ml
síran amonný	10 g
kyselý fosforečnan draselný	1 g
síran hořečnatý	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 96 hodin. Od 24. hodiny kultivace se podle hodnoty pH dává do média kombinovaná směs zdrojů uhlíku tohoto složení:

kyselina octová koncentrovaná	100 ml
octan amonný	25 g
kyselina mléčná koncentrovaná	75 ml
sacharóza	100 g
voda	150 ml

Směs se dává v množství 1 až 2 % obj. /vztaženo na objem média/ mezi 24. až 72. hodinou fermentace, při pH média 7,8 až 8,2, jehož hodnota se tím snižuje na 7,0 až 7,5. Produkce lysinu činí 33 až 35 g/litr média.

P ř í k l a d 2

Kmenem *Corynebacterium glutamicum* se zaočkuje 60 ml inokulačního média v 500 ml varné baňce, která má stejné složení jako v příkladu 1 a kultivuje se za stejných podmínek jako v tomto příkladě. Kulturou vyrostlou za 24 hodin kultivace se zaočkuje 800 ml fermentačního média ve dvoulitrovém fermentačním tanku. Médium má stejné složení jako v příkladu 1. Kultivuje se při 800 ot./min, vzdušnění stejným objemem vzduchu/min, při teplotě 29 až 30 °C, po dobu 96 hodin. Od 6. hodiny fermentace se do tanku přidává v dávkách po 15 ml roztok kombinované směsi zdrojů uhlíku /složení jako v příkladu 1/, a to tak, aby se pH fermentačního média udržovalo na hodnotě 7,0 až 7,5. V 96. hodině fermentace se dosáhne produkce lysinu 38 g/litr média.

P ř í k l a d 3

Kmenem *Corynebacterium glutamicum* se zaočkuje 60 ml inokulačního média stejného složení jako v příkladu 1, umístěného v 500 ml varných baňkách a kultivuje se za stejných podmínek jako v tomto příkladu. Inokulem vyrostlým za 24 hodin se zaočkuje 10 litrů fermentačního média /složení jako v příkladu 1/ ve 20litrovém fermentačním tanku. pH fermentačního média má po sterilizaci hodnotu 7,0 až 7,2. Fermentuje se za těchto podmínek: míchání 470 ot./min dvěma otevřenými turbínovými míchadly o průměru poloviny průměru tanku, vzdušnění stejným objemem vzduchu, teplota při kultivaci 20 až 30 °C. Po 5 až 7 hodinách kultivace se při dosažení hodnoty pH média 7,8 až 8,0 dává kombinovaná směs zdrojů uhlíku /složení jako v příkladu 1/ při standardním udržování pH na hodnotě 7,5 pomocí automatického regulátoru pH s dávkovačem. Po 96 hodinách fermentace se dosáhne produkce 40 g lysinu/litr média.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob fermentační přípravy L-lysínu kultivací produkčních mikroorganismů, zejména rodu *Corynebacterium* nebo *Brevibacterium*, v tekutých živných půdách, obsahujících zdroj asimilovatelného uhlíku a dusíku a minerální živné soli, za submerzních podmínek, vyznačující se tím, že se produkční mikroorganismus nejprve namnoží v inokulační půdě obsahující sůl kyseliny octové s alkalickým kovem nebo sůl amonnou v množství 40 až 60 gramů/litr média a sacharózu v množství 20 až 30 g/litr média a zdroj dusíku, potom se získanou kulturou zaočkuje fermentační půda, určená pro nárůst kultury produkčního mikroorganismu, s hodnotou pH 7 až 8, s vý-

hodou 7,2 až 7,5, obsahující jako jediný zdroj asimilovatelného uhlíku sůl kyseliny octové s alkalickým kovem nebo sůl amonnou v množství 38 až 42 g/litr média, načež se po zahájení fermentace při dosažení hodnoty pH média 7,5 až 8,0 udržuje v dalším průběhu fermentace pH na hodnotě 7,0 až 7,5, dávkováním kombinované směsi zdrojů uhlíku obsahující 90 až 110 hmotnostních dílů kyseliny octové, 20 až 30 hmotnostních dílů octanu amonného, 65 až 85 hmotnostních dílů kyseliny mléčné, 90 až 110 hmotnostních dílů sacharózy a 140 až 160 hmotnostních dílů vody, až do ukončení fermentace.