

ROMANIA

(19) OFICIUL DE STAT
PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
București



(11) Nr. brevet: **109221 B1**
(51) Int.Cl.⁵ C 12 P 13/08;
C 12 N 1/20

(12)

BREVET DE INVENTIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **146662**

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(22) Data de depozit: **03.01.91**

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(30) Prioritate:

(86) Cerere internațională PCT:
Nr.

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(87) Publicare internațională:
Nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
30.12.94 BOPI nr. 12/94

(56) Documente din stadiul tehnicii:
RO 64795

(45) Data publicării brevetului:
BOPI nr.

(71) Solicitant: **Jurcoane Stefana, București, RO**

(73) Titular: (72)

(72) Inventatori: **Jurcoane Ștefana, Ioniță Ana, Mocanu Eugenia, Raianu Gabriela, Geicu Silvia, București, Gomotirceanu Petrică, Gheorghe Gabriel, Calafat, Răitaru Geta, Iancu Elena, București, RO**

(54) Procedeu de obținere a L - lizinei, prin fermentație

(57) Rezumat: Invenția se referă la un procedeu de obținere a L-lizinei, prin fermentație, constând din cultivarea unui microorganism producător de lizină, pe un mediu de cultură, conținând 10 % melasă, 3 % extract de porumb, 3 % clorură de amoniu, 0,27 % superfosfat și 1 % carbonat de calciu, sub aerare și agitare, la $pH = 6,8 \dots 7,5$, timp de 66 ... 70 h și

separarea produsului din mediul de cultură, caracterizat prin aceea că extractul de porumb se înlocuiește, în proporție de 80 ... 84 %, cu un hidrolizat acid de șrot de soia sau de drojdie, sau de ghilen.

Revendicări: 1

RO 109221 B1



Invenția se referă la un procedeu de obținere a L-lizinei, prin fermentație, aminoacid esențial utilizat la îmbogățirea furajelor, pornind de la medii de cultură de bază de hidrolizate proteice (hidrolizare acidă de soia, drojdie furajeră și gluten de porumb).

Este cunoscută obținerea L-lizinei, prin fermentarea cu ajutorul microorganismelor (tulpini mutante: *Brevibacterium lactofermentum* ICCF-3, *Brevibacterium lactofermentum* ICCF-4, *Brevibacterium lactofermentum* ICCF-10, *Corynebacterium melassecola* ICCF-6) a unor hidrați de carbon, ca glucoza și zaharoza, în prezență extractului de porumb ca sursă de azot și săruri minerale (RO 64795, 65098, 65097).

Procedeu, conform invenției, constă în aceea că extractul de porumb se înlocuiește în proporție de 80 ... 84% cu un hidrolizat acid de șrot de soia, sau de drojdie, sau de gluten.

Prin aplicarea invenției se lărgeste gama de produse naturale utilizate ca sursă de azot și factori de creștere în biosinteza L-lizinei.

Se dau, în continuare, trei exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1. a) Prepararea hidrolizatului de soia

În continuare, se descrie modul de lucru pentru prepararea unei șarje de 45 kg hidrolizat de soia.

Pentru hidroliză se folosește un vas emailat de 60 l, prevăzut cu agitator ancoră și refrigerent cu reflux, precum și cu manta de încălzire și răcire și teacă termometrică.

Se prepară 40 kg HCl 2N prin diluarea a 7 l (9 kg) HCl concentrat și 31 l apă comună, sub agitare. Se toarnă soluția obținută în vas și se adaugă, sub agitare, 10 kg șrot soia, ca substanță uscată, respectiv 10,5 kg ca atare.

Se încălzește suspensia cu aburi în manta, sub agitare, până la fierbere (103°C), menținând apoi amestecul la această temperatură, timpul necesar pentru hidroliză, (4...6 h). În final, gradul de hidroliză trebuie să fie de 47%, ceea ce se verifică prin raportul azot aminio/azot total. Se oprește încălzirea și se răcește cu apă în manta sub agitare. Se golește în butoaie de plastic, unde se poate păstra 6 luni fără să se deterioreze la temperatura mediului ambiant. Se obțin circa 45 kg

hidrolizat.

b) Prepararea inoculului

Se însămânțează cu o suspensie (în soluție de NaCl 0,15 N, având D.O. = 0,1 ... 0,2 la diluția 1/10) dintr-o cultură de pe geloză nutritivă 2% de *Corynebacterium lelaesecola* ICCF-16 următorul mediu de inocul (proporția de însămânțare 0,1%): 2% melasă din sfeclă de zahăr (calculat ca substanță reductoare), 1,5% extract de porumb (calculat ca substanță uscată), 0,4% NaCl, 6,5 ... 6,8 pH înainte de sterilizare, 6,0 ... 6,5 pH după sterilizare (sol. NaOH 40%).

Mediul se repartizează câte 75 ml în flacoane Erlenmayer, capacitate 750 ml. Se dezvoltă apoi timp de 8 ... 72 h pe un agitator rotativ cu 220 rot/min.

c) Fermentația

Mediul conținând inoculul se transvazează în proporție de 1%, într-un mediu de fermentație cu următoarea compoziție: 10% melasă din sfeclă de zahăr (calculată ca substanță reductoare), 0,5% extract de porumb (calculat ca substanță uscată), 2,5% hidrolizat de soia (calculat ca echivalent în azot total cu 2,5% extract porumb), 0,3% superfosfat de calciu, 2,5% clorură de amoniu, 0,1% ulei vegetal (de floarea soarelui și soia), 1% CaCO₃, 6,5 ... 7,0 pH înainte de sterilizare, 6,5 ... 7,0 pH după sterilizare, ajustat cu NaOH 40% sau NH₃.

Fermentația s-a realizat într-un fermentator de capacitate 150 l cu fund și capac din oțel inoxidabil, prevăzut cu agitator, turbină cu 4 paleți drepte și turația 340 rot/min.

Parametrii de fermentație au fost: 0,5 at presiune aer, 0,5 l/1/min debit de aer, temperatură 31°C, turație agitator 340 rot/min.

În caz de spumare se adaugă ulei vegetal de floarea soarelui și soia în proporție de 0,1 %.

În vederea urmăririi procesului se scot probe din 8 în 8 h pentru determinarea consumului de zahăr, evoluția biomasei și din 24 în 24 h pentru dozarea L-lizinei produse.

Fermentația durează între 68 și 72 h. La sfârșitul fermentației zahărul reductoare are valoarea sub 1%, iar L-lizina din mediu de fermentație este de circa 31 g/l dozată prin metoda cromatografiei pe hârtie.

Exemplul 2. a) Se prepară circa 45

kg hidrolizat de drojdie furajeră (obținută din N-parafine) după următoarea rețetă de lucru: la 10 kg drojdie furajeră, ca atare se adaugă, sub agitare, peste 40 kg HCl 2 N.

Pentru prepararea hidrolizatului acid de drojdie furajeră se procedează ca în exemplul 1.

b) Se prepară preinoculul în modul arătat în exemplul 1.

c) Fermentația

Mediul conținând inoculul se transvazează în proporție de 1%, într-un mediu de fermentație cu următoarea compoziție: 10% melasă din sfeclă de zahăr (calculată ca substanță reducătoare), 0,5% extract de porumb (calculat ca substanță uscată), 2,5% hidrolizat de drojdie furajeră (calculat ca echivalent în azot total cu 2,5% extract de porumb), 0,3% superfosfat de calciu, 2,5% clorură de amoniu, 0,1% ulei vegetal (de floarea soarelui și soia), 1% CaCO_3 , 6,5 ... 7,0 pH înainte de sterilizare, 6,5 ... 7,0 pH după sterilizare, ajustat cu NaOH 40% sau soluție de NH_3 .

În ceea ce privește condițiile de lucru, se procedează ca în exemplul 1.

Parametrii de fermentație, consumul de zahăr, pH-ul și evoluția biomasei au condus la formarea de 33 g/l L-lizină HCl în 70 h fermentație.

Exemplul 3 . a) Prepararea hidrolizatului acid de gluten de porumb

Glutenul reprezintă partea proteică din bobul de porumb și rezultă din fabricația amidonului și glucozei.

Pentru hidroliza glutenului, datorită substanței uscate mici a produsului care variază între 2 și 7%, rețeta de hidroliză a fost

deosebită, în calculul concentrației de HCl 2N ținându-se seama de apa înglobată în produs.

Se prepară circa 50 kg hidrolizat de gluten, adăugând, sub agitare, 8,3 kg HCl concentrat peste 40 kg gluten (cu 6,4% substanță uscată).

Modul de lucru și condițiile de hidroliză sunt cele prezentate în exemplul 1.

b) Se prepară preinoculul în modul arătat în exemplul 1.

c) Fermentație

Mediul de fermentație are aceeași compoziție cu cel din exemplul 1, cu deosebirea că în locul hidrolizatului acid de șrot de soia se adaugă hidrolizat acid de gluten de porumb, în proporție de 2,5% (calculat ca echivalent în azot total cu 2,5% extract de porumb). La sfârșitul fermentației în mediu s-au acumulat 30 g/l L-lizină HCl dozată prin metoda cromatografiei pe hârtie.

Revendicare

Procedeu de obținere a L-lizinei, prin fermentație, conținând din cultivarea unui microorganism producător de lizină, pe un mediu de cultură conținând 10% melasă, 3% extract de porumb, 3% clorură de amoniu, 0,27% superfosfat și 1% carbonat de calciu sub aerare și agitare la pH = 6,8 ... 7,5, timp de 66 ... 70 h și separarea produsului din mediul de cultură, caracterizat prin aceea că extractul de porumb se înlocuiește în proporție de 80 ... 84% cu un hidrolizat acid de șrot de soia sau de drojdie sau de gluten .

Președintele comisiei de examinare: biolog Nicola Nicolin
Examintor: biochim. Crețu Adina

