



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

201812
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 13/08

(22) Přihlášeno 20 09 78
(21) (PV 6311-78)

(40) Zveřejněno 31 03 80

(45) Vydáno 15 02 83

(75)
Autor vynálezu

BUČKO MICHAL ing. CSc., SÁLKA JÁN ing., HANO ALEXANDER, HOFBAUER HENRICH ing., MIKLÁŠ EMIL, ing., BULLA JÁN ing., BANSKÁ BYSTRICA, PLACHÝ JIŘÍ RNDr. CSc., VANICKÝ MIROSLAV, ROZTOKY U PRAHY, ULBERT STANISLAV ing., CHROMÍK JINDŘICH ing., ČULÍK KAREL RNDr. a SEVERA ZDENĚK ing., PRAHA

(54) Způsob biosyntetické výroby L-lysinu

Vynález se týká způsobu biosyntetické výroby L-lysinu pomocí vhodných produkčních mikroorganismů. Především se týká takového způsobu, který umožňuje využití méně hodnotných a/nebo odpadních surovin jako zdrojů asimilovatelného uhlíku a/nebo dusíku a/nebo stimulačních biofaktorů, samozřejmě s přísadou obvyklých minerálních živných solí.

Je známo více způsobů biosyntézy L-lysinu, při kterých se používá jako hlavního zdroje energie uhlíkatých surovin, zejména sacharózy, a to ve formě rafinovaného řepného nebo třtinového cukru, popřípadě ve formě řepné nebo třtinové melasy, která je surovinou podstatně levnější než čistá sacharóza. Jako zdrojů asimilovatelného dusíku organického původu se využívá zejména kukuřičné máčecí vody a hydrolyzáty arašidové nebo sójové mouky (britský pat. spis č. 851.396, US pat. spis č. 2, 979.439, francouzský pat. spis č. 1, 533.688, NSR pat. spis č. 2, 321.461, japonské pat. spisy č. 7661-691 (76) a 7626-293 (76).

Při použití sacharózy nebo melasy, surovin s velmi rozdílnými cenami, se při biosyntéze dosahuje značně odlišných výtěžků. S čistou sacharózou lze dosáhnout výtěžků L-lysinu 40 až 90 g/litr, melasa, s nízkou koncentrací sacharózy, s vysokým obsahem solí, popřípa-

dě i depresivních látek, podle agrotechniky používané při pěstování cukrové řepy nebo třtiny, poskytuje výtěžky podstatně nižší, a to 25 až 45 g/litr, v závislosti na kmeni a na úrovni fermentačního zařízení. Použití obou jmenovaných surovin je omezeno jednak vysokou cenou čisté sacharózy, jednak relativní nedostupností melasy, která se převážně spotřebuje ke krmným účelům přímo.

Vznikl tedy úkol hledat a najít jiné levnější a/nebo dostupnější suroviny jako vhodné zdroje živin a biofaktorů pro biosyntézu L-lysinu, které by mohly nahradit čistou sacharózu a další deficitní suroviny.

Tento úkol řeší podle vynálezu způsob biosyntetické výroby L-lysinu kultivací produkčních mikroorganismů v tekuté půdě obsahující zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, stimulatorů a biofaktorů a minerální živní soli, za aerobních podmínek; podstata vynálezu spočívá v tom, že se jako úplných nebo částečných zdrojů asimilovatelného uhlíku a/nebo dusíku a/nebo biofaktorů v růstové a/nebo produkční fázi biosyntézy používá jednotlivě nebo ve směsi surovin nebo odpadních produktů nebo meziproduktů průmyslu potravinářského, například cukrovarnického, škrobárenského, masného, mlékárenského nebo tukového, popřípadě farmaceutického nebo kožedělného.

Je účelné, když se v růstové fázi biosyntézy používá jako zdroje asimilovatelného uhlíku surového třtinového nebo řepného cukru nebo těžké cukerné šťávy, jako zdroje převážně dusíku hydrolyzátu zbytků pankreatu po výrobě inzulínu nebo hydrolyzátu krve, jako zdroje převážně dusíku a biofaktorů zahuštěné bramborové máčecí vody, jako zdroje převážně biofaktorů melasy v množství 1 až 10 % hmot., s výhodou 2 až 4 % hmot., vztaženo na celkový objem živné půdy, a v produkční fázi biosyntézy jako zdrojů asimilovatelného uhlíku matečných louhů po výrobě glukózy ze sacharózy nebo ze škrobu nebo/a hydrolyzátu syrovátky nebo/a melasy nebo/a surového třtinového nebo řepného cukru, jejichž množství v živné půdě se udržuje dávkováním na 0,1 až 6,0 hmot., s výhodou 0,5 až 3 % hmot., vztaženo na celkový objem živné půdy.

Lze samozřejmě používat i jiných zdrojů uhlíku a/nebo dusíku a/nebo biofaktorů, popřípadě jejich kombinací, než těch, které byly jmenovány výše, pokud jejich vlastnosti nepřekážejí optimálnímu průběhu biosyntézy L-lysinu.

Když se nové zdroje základních živin podle vynálezu vhodně kombinují nebo vhodně aplikují v jednotlivých fázích biosyntetického procesu, lze například jak v růstové, tak i v produkční fázi optimálním způsobem využívat stimulačního účinku doprovodných biofaktorů a zároveň se vyhnout kritickým koncentracím těch balastů, které inhibují růst mikroorganismu nebo jeho produkci.

Jako nové zdroje pro náhradu sacharózy, popřípadě pro kombinaci různých zdrojů asimilovatelného uhlíku a/nebo dusíku, se například velmi dobře osvědčily matečné louhy po výrobě čisté glukózy ze sacharózy nebo škrobu, které obsahují fruktózu a glukózu nebo glukózu a maltózu v různé koncentraci a v různém vzájemném poměru; pro případnou kombinaci s jinými zdroji uhlíku se velmi dobře osvědčil surový cukr s obsahem 3 až 15 % hmot. balastních látek nebo surová cukerná šťáva, která je ze všech produktů cukrovarnického průmyslu nejlevnější stabilní surovinou. Tyto zdroje mohou být výhodně kombinovány i s melasou, která obsahuje stopy pesticidních a herbicidních látek použitých v průběhu pěstování cukrové řepy nebo třtiny. Účelná kombinace zdrojů uhlíku umožňuje snížení koncentrace těchto toxických příměsí na únosnou míru.

Dalším ověřeným výhodným zdrojem uhlíku, popřípadě částečně i dusíku, je sladká nebo kyselá syrovátka v původním nebo zahuštěném stavu, která se dá po hydrolýze použít pro biosyntézu L-lysinu. Jako zdroje esenciálních aminokyselin, dalších biofaktorů a organického dusíku se osvědčily zejména zahuštěná bramborová máčecí voda, hydrolyzát zbytků pankreatu po výrobě inzulínu nebo hydrolyzát krve a jiných odpadních jačecích materiálů, a to buď samotné, nebo v kombinaci s tradičními zdroji dusíku, jako

je kukuřičný výluh nebo hydrolyzát arašidové nebo sójové mouky. Zejména použití hydrolyzátu zbytků pankreatu jako zdroje aminodusíku je obzvláště výhodné, neboť na rozdíl od tradičního hydrolyzátu arašidové nebo sójové mouky obsahuje tato surovina podstatně menší množství vedlejších toxických zplodin, které při hydrolýze mouky vznikají hlavně reakcemi mezi aminokyselinami a cukry uvolněnými hydrolýzou škrobu. Lze proto do živné půdy dávkovat větší množství hydrolyzátu a kultivovat buňky při vyšším obsahu aminodusíku a dosáhnout podstatně vyšších výtěžků za stejnou kultivační dobu.

Způsob podle vynálezu představuje mnoho možností z hospodárnění výroby L-lysinu, aminokyseliny důležité pro živočišnou výrobu.

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

Příklad 1

Kultúrou kmene *Corynebacterium* sp., kultivovanou při teplotě 28 °C po dobu 24 hodin za aerobních podmínek na třepacím stroji v Erlenmayerově baňce, plněné 60 ml média s obsahem 2 % hmot. sacharózy a 1,5 % hmot. kukuřičného výluhu (obsah 65 % sušiny) bylo inokulováno 10 litrů sterilní očkovací půdy ve 20 litrovém tanku, obsahující 5 % hmot. surového třtinového cukru a 2 % hmot. kukuřičného výluhu. Inkubace inokula se uskutečnila při 29 °C po dobu 16 hodin, za míchání 400 ot/min a vzdušnění 10 litrů vzduchu/min.

Do 5ti 20 litrových tanků bylo připraveno po 10 litrech živné půdy. Ve 4 tancích byla půda níže uvedeného složení, v 5. tanku byla kontrolní půda s 18 % hmot. čisté sacharózy. Všechny půdy byly sterilizovány 20 min. při 120 °C. Složení živné půdy v tancích č. 1 až 4:

surový třtinový cukr (90 % sacharosy)	20 %
hydrolyzát arašidové mouky	25 %
kukuřičný výluh (65 % sušiny)	0,3 %
primární fosforečnan draselný	0,2 %
síran hořečnatý kryst.	0,05 %
technický biotin (1 % biotinu)	0,0005 %
polypropylenglykol	0,02 %
pH	7,0

Sterilní živná půda v tancích byla inokulována po 1 litru inokula z očkovacího tanku. Kultivace probíhala při 29 °C, za míchání 450 ot/min a vzdušnění 10 litrů vzduchu/min, při pH udržovaném přidávkou čpavku v rozmezí 6,0 až 7,2. Ve 36. hodině kultivace, kdy původní zdroj uhlíku v půdě byl již téměř všechen spotřebován a sušina biomasy dosáhla hodnoty 3 % (vztaženo na objem půdy), bylo přidáno do tanku č. 1 600 ml zředěné třtinové melasy s obsahem 300 g sacharózy,

do tanku č. 2 600 ml zředěné řepné melasy s obsahem 300 g sacharózy, do tanku č. 3 6000 ml matečných louhů po výrobě čisté glukózy ze sacharózy s obsahem 300 g směsi fruktózy a glukózy, do tanku č. 4 600 ml roztoku surového cukru s obsahem 300 g sacharózy a do tanku č. 5 600 ml roztoku čisté sacharózy s obsahem 300 g sacharózy. Stejně

dávky uvedených zdrojů uhlíku byly přidávány do příslušných tanků vždy po spotřebování předchozí dávky, což se projevilo vzestupem pH na hodnotu 7,0, naposled v 60. až 65. hodině kultivace. V 72. hodině byla fermentace ukončena. Výťažky dosažené v jednotlivých tancích jsou shrnuty v tabulce č. 1.

Tabulka 1

Tank č.	Zdroj uhlíku		Celková spotřeba cukru v kg	Objem půdy v l	Produkce lysinu		Konverze cukru na lysin v %
	v růstové fázi	v produkční fázi			g/l	g celkem	
1.	surový třtinový cukr	třtinová melasa	3,6	15,0	63,6	955	26,5
2.	surový třtinový cukr	řepná melasa	3,3	14,4	58,0	835	25,3
3.	surový třtinový cukr	mat. louh po výrobě glukózy	3,6	15,0	67,7	1017	28,2
4.	surový třtinový cukr	surový třtinový cukr	3,0	13,8	58,0	800	26,7
5.	čistá sacharóza	čistá sacharóza	3,3	14,4	60,7	874	26,45

Příklad 2

Do 5 20litrových tanků bylo připraveno po 10 litrech živné půdy různého složení a sterilizováno 20 min při 120 °C.

Složení (obsah sacharózy v kg, obsah amidusíku v g, hydrolyzát arašidové mouky v g):

	I	II	III	IV	V
těžká cukerná šťáva	1,8	1,8	—	—	—
surový třtinový cukr	—	—	1,8	—	—
surový řepný cukr	—	—	—	1,8	—
sacharóza	—	—	—	—	1,8
hydrolyzát arašidové mouky	15	15	—	15	15
zahuštěná bramborová máčecí voda (50 % sušiny) v g	100	100	100	100	—
melasa třtinová v g	—	—	—	—	400
primární fosforečnan draselný v g	20	20	20	20	20
síran hořečnatý kryst. v g	5	5	5	5	5
techn. biotin (1 % biotinu) v mg	50	50	50	50	50

Po sterilizaci byly živné půdy očkované po 1 litru inokula jako v příkladu 1. Kultivace probíhala při 29 °C, za míchání 450 ot/min a vzdušnění 10 litrů vzduchu/min, při pH udržovaném přidávkou čpavku v rozmezí 6,0 až 7,2. Ve 36. hodině kultivace, kdy původní zdroj uhlíku v půdě byl již téměř všechen spotřebován a sušina biomasy dosáhla hodnoty 3 % (vztaženo na objem půdy), bylo přidáno do tanku I 600 ml zředěné těžké cukerné šťávy s obsahem 300 g sacharózy, do tanku II 600 ml matečných louhů po výrobě glukózy ze škrobu s obsahem 300 g glukózy, do tanku III 600 ml hydrolyzátu sladké sy-

rovátky s obsahem 300 g glukózy, do tanku IV 600 ml hydrolyzátu kyselé syrovátky s obsahem 300 g glukózy a do tanku V 600 ml matečných louhů po výrobě glukózy ze sacharózy s obsahem 300 g směsi fruktózy a glukózy. Stejně dávky uvedených zdrojů uhlíku byly přidávány do příslušných tanků vždy po spotřebování předchozí dávky, což se projevilo vzestupem pH nad hodnotu 7,0. Naposled byly zdroje uhlíku přidány v 60. až 65. hodině kultivace a v 72. hodině byla fermentace ukončena. Výťažky dosažené v jednotlivých tancích jsou shrnuty v tabulce č. 2.

Tabulka 2

Tank č.	a) zdroj uhlíku b) zdroj dusíku c) zdroj biofaktorů	Celková spotřeba cukru kg	Objem půdy l	Produkce lysinu		Konverze cukru na lysin na lysin v %	
	v růstové fázi			v produkční fázi	g/l		g celkem
I.	a) těžká cukr. šťáva b) hydrolyzát arašidové mouky c) ZBMV (+)	těžká cukr. šťáva	3,3	14,4	61,5	885	26,8
II.	a) „ b) „ c) „	mat. louh po výrobě glukózy ze škrobu	3,0	13,8	56,8	784	26,1
III.	a) surový třtinový cukr b) ZBMV	hydrolyzát sladké syrovky	2,7	13,2	55,0	726	26,9
IV.	a) surový řepný cukr b) hydrolyzát arašidové mouky c) ZBHV	hydrolyzát kyselé syrovátky	3,0	13,8	59,4	820	27,3
V.	a) sacharóza b) hydrolyzát arašidové mouky c) melasa (4%-ní)	mat. louh po výrobě glu- kózy ze sacharózy	3,9	15,6	75,0	1170	30,0

(+) = zahuštěná bramborová máčecí voda

Příklad 3

Do 5 20litrových fermentačních tanků bylo

připraveno po 10 litrech živné půdy různého složení a sterilizováno 20 min při 120 °C.

Složení (obsah sacharózy v kg, obsah aminodusíku v g⁽⁺⁾):

	A	B	C	D	E
sacharóza	1,8	1,8	—	—	—
surový třtinový cukr	—	—	1,8	1,8	1,8
(+) hydrolyzát arašidové mouky	—	8	8	—	—
(+) hydrolyzát pankreatu	20	12	12	20	12
1) ZBMV v g 50 % sušiny	100	—	100	—	660
řepná melasa v g	—	300	—	300	300
primární fosforečnan draselný v g	20	20	20	20	20
krystalický síran hořečnatý v g	5	5	5	5	5
technický biotin (1 % biotinu) v mg	50	50	50	50	50
polypropylenglykol v ml	2	2	2	2	2
pH	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2

1) zahuštěná bramborová máčecí voda.

Po sterilizaci byly živné půdy očkované po 1 litru inokula jako v příkladu 1. Kultivace probíhala při 29 °C za míchání 450 ot/min a vzdušnění 10 litrů vzduchu/min, při pH udržovaném přidávkou čpavku v rozmezí 6,0 až 7,2. Ve 36. hodině kultivace bylo do tanků A a B přidáno po 450 ml roztoku sacharózy s obsahem 300 g sacharózy, do tanků C a D po 450 ml roztoku surového třtinového cukru s obsahem 300 g sacharózy a do tanku E 450

ml matečných louhů po výrobě glukózy ze sacharózy s obsahem 300 g směsi fruktózy a glukózy. Stejně dávky uvedených zdrojů byly přidávány do příslušných tanků vždy po spotřebování předchozí dávky, což se projevilo vzestupem pH nad hodnotu 7,0. Naposled byly zdroje uhlíku přidány v 60. až 65. hodině kultivace a v 72. hodině byla fermentace ukončena. Výťažky dosažené v jednotlivých tancích jsou shrnuty v tabulce č. 3.

Tabulka 3

Tank č.	a) zdroj uhlíku b) zdroj dusíku c) zdroj biofaktorů	Celková spotřeba cukru kg	Objem půdy l	Produkce		Konverse cukru na lysin v %	
	v růstové fázi			v produkční fázi	g/l		g celkem
A	a) čistá sacharóza b) hydrolyzát pankreatinu c) ZBMV	čistá sacharóza	4,2	14,9	82,5	1230	29,3
B	a) čistá sacharóza b) hydrolyzát arašidové mouky + hydrolyzát pankreatin c) melasa (3%)	čistá sacharóza	3,3	13,6	75,0	1020	30,9
C	a) sur. třtin. cukr b) hydrolyzát arašidové mouky + hydrolyzát pankreatin c) ZBMV	surový třtinový cukr	3,3	13,6	68,8	936	27,5
D	a) surový třtinový cukr b) hydrolyzát pankreatin c) melasa (3%)	surový třtinový cukr	3,9	14,5	80,0	1160	29,7
E	a) surový třtinový cukr b) hydrolyz. pankr. + ZBMV	mat. louh pro výrobu glu- kozy ze sacharózy	3,6	14,0	73,6	1030	28,6

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob biosyntetické výroby L-lysinu kultivací produkčních mikroorganismů v tekuté živné půdě obsahující zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, stimulatorů a biofaktorů a minerální živné soli, za aerobních podmínek, vyznačující se tím, že se jako úplných nebo částečných zdrojů asimilovatelného uhlíku a/nebo dusíku a/nebo biofaktorů v růstové a/nebo produkční fázi biosyntézy používá jednotlivě nebo ve směsi surových nebo odpadních produktů nebo meziproductů průmyslu potravinářského, například cukrovarnického, škrobárenského, masného, mlékařského nebo tukového, popřípadě farmaceutického nebo kožedělného, přičemž v růstové fázi biosyntézy se používá jako zdroje asimilovatelného uhlíku surového třtinového nebo řepného cukru nebo těžké cukerné štá-

vy, v množství, odpovídajícímu počátečnímu obsahu 18 % hmot. čisté sacharózy v živné půdě, jako zdroje převážně dusíku hydrolyzátu zbytků pankreatu po výrobě inzulinu nebo hydrolyzátu krve, jako zdroje převážně dusíku a biofaktorů zahuštěné bramborové máčecí vody, jako zdroje převážně biofaktorů melasy v množství 1 až 10 % hmot., s výhodou 2 až 4 % hmot., vztaženo na celkový objem živné půdy, a v produkční fázi biosyntézy jako zdrojů asimilovatelného uhlíku matečných louhů po výrobě glukózy ze sacharózy nebo ze škrobu nebo/a hydrolyzátu syrovátky nebo/a melasy nebo/a surového třtinového nebo řepného cukru, jejichž množství v živné půdě se udržuje dávkováním na 0,1 až 6,0 % hmot., s výhodou 0,5 až 3,0 % hmot., vztaženo na celkový objem živné půdy.

OPRAVA

popisu vynálezu k autorskému osvědčení č. 201 812

V popisu vynálezu k autorskému osvědčení č. 201 812 má
být v záhlaví:

Místo: (22) Přihlášeno 20 09 78

Správně: (22) Přihlášeno 29 09 78

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY