



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

202884

(11)

(B1)

/22/ Přihlášeno 29 12 78
/21/ /PV 9136-78/

(51) Int. Cl.³
C 12 P 13/08

(40) Zveřejněno 30 05 80

(45) Vydáno 15 09 82

(75)

Autor vynálezu

SMĚKAL FRANTIŠEK RNDr. CSc., PRAHA, PLACHÝ JIŘÍ RNDr. CSc.,
ROZTOKY u Prahy a ČULÍK KAREL RNDr., PRAHA

(54) Způsob fermentační přípravy L-lysinu

1

Vynález se týká způsobu fermentační přípravy L-lysinu, a to kultivací kmenů *Corynebacterium* produkujících L-lysin v tekuté živné půdě, která obsahuje na počátku fermentace jako hlavní zdroj uhlíku soli kyseliny octové, komplexní zdroje dusíku a minerální živné soli.

Je známo více způsobů fermentační přípravy L-lysinu, při kterých se původně používaný zdroj asimilovatelného uhlíku, tj. sacharosa, nahrazuje jinými levnějšími a dostupnějšími zdroji, i za cenu o něco nižší produkce L-lysinu. Tak například je popsána fermentace kmene *Corynebacterium glutamicum* v půdě s ethanolem jako jediným zdrojem uhlíku pro růst produkčního mikroorganismu a produkci L-lysinu a močovinou a NZ-aminem /obchodní produkt neurčeného složení/ jako zdroji dusíku. V průběhu fermentace se do půdy dává směs ethanolu a močoviny v určitých poměrech v závislosti na pH-indikátoru, který je přítomen ve fermentačním médiu /australský pat. spis č. 51577/.

Analogický postup s použitím fermentačního média jiného složení uvádí americký pat. spis č. 3 595 751. Dále je popsán technologický postup biosyntézy L-lysinu s produkčními kmeny *Brevibacterium lactofermentum*, užívající jako zdroje uhlíku a dusíku směsi kyselina octová-octan amonný nebo ethanol-čpavek /NSR pat. spis č. 2 321 461/. Aktuální koncentrace ethanolu ve fermentačním médiu je sledována plynovou chromatografií.

Úkolem vynálezu bylo najít vhodné zdroje asimilovatelného uhlíku, které by pokud možno nahradily v produkční fázi drahou a deficitní sacharosu bez podstatného zásahu do obvyklé technologie a bez podstatného snížení výtěžků L-lysinu. Podařilo se vypracovat způsob fermentační přípravy L-lysinu kultivací kmenů *Corynebacterium* produkujících L-lysin v tekuté živné půdě obsahující na počátku fermentace jako hlavní zdroj uhlíku soli kyseliny octové, komplexní zdroje dusíku a minerální živné soli, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se v průběhu fermentace přidává do půdy po dosažení hodnoty pH 7,8 až 8,0 ve více dávkách obsahující 600 ml ethanolu, 100 ml kyseliny octové, 66 g sacharosu a vodu do objemu 1 000 ml, v takových časových intervalech, aby koncentrace ethanolu v půdě činila 0,60 až 0,75 % hmot. a hodnota pH 7,0 až 7,2, načež se po dosažení maxima produkce fermentace ukončí. Jako kmene

Corynebacterium, vhodného pro fermentaci podle vynálezu, lze použít kmene Corynebacterium glutamicum, dependentního na homoserin a leucin a rezistentního k S-aminoethylcysteinu, popřípadě kmene, který je dependentní na homoserin a leucin a rezistentní k aminomethylthiomásečné kyselině.

Podle povahy použitého produkčního kmene lze způsobem podle vynálezu dosáhnout po 72 hodinách fermentace produkce L-lysinu 16 až 26 g/litr média, při podstatné úspoře sacharosy.

Bližší podrobnosti jsou patrné z příkladů provedení.

Příklady provedení:

P ř í k l a d 1

Kmenem Corynebacterium sp. se zaočkuje 60 ml inokulační půdy, umístěné v 500 ml varné baňce, tohoto složení:

octan sodný	1,5 g
sacharosa	2,0 g
kukuřičný extrakt /60žní/	3,0 g
voda	do 100,0 ml

pH půdy před sterilizací 7,2, sterilizace 30 minut při 120 °C. Po zaočkování se kultivuje na rotační třepačce /240 ot/min/ 18 hodin při teplotě 29 °C. Kulturou vyrostlou v baňce se zaočkuje 800 ml půdy ve dvoulitrových fermentačních tankách, jež má toto složení:

octan sodný	20 g
kukuřičný extrakt /60žní/	10 g
hydrolyzát arašídové mouky	150 ml
síran amonný	10 g
fosforečnan draselný sek.	1 g
síran hořečnatý	0,1 g
uhličitan vápenatý	30 g
biotin	50 µg
vitamin B ₁	100 µg
voda	do 1 000 ml

pH půdy před sterilizací 7,2, sterilizace 30 minut při 120 °C. Po zaočkování se kultivuje při teplotě 29 až 30 °C, vzdušnění stejným objemem vzduchu/min, míchání 800 ot/min. V průběhu fermentace se po dosažení pH 7,8 až 8,0 dává v intervalech po 6 hodinách a v dávkách po 10 ml ethanolová směs tohoto složení: ethanol 600 ml, kyselina octová 100 ml, sacharosa 66 g, voda do 1 000 ml. Během 72 hodin fermentace se do tanků přidá celkem 100 ml uvedené směsi, která obsahuje zdroje uhlíku v tomto celkovém množství /přepočítáno na 1 litr média/: ethanol 66 g, kyselina octová 11 g a sacharosa 7 g. Produkce L-lysinu po 72 hodinách fermentace činí 16 až 18 g/litr fermentačního média.

P ř í k l a d 2

Kmenem Corynebacterium glutamicum, dependentním na homoserin a leucin a rezistentním k analogu lysinu, S-aminoethylcysteinu, se zaočkuje 60 ml inokulačního média, umístěného v 500 ml varné baňce, stejného složení jako v příkladu 1 a kultivuje se za stejných podmínek jako v tomto příkladu. Laboratorní dvoulitrové fermentační tanky se naplní po 800 ml fermentačního média stejného složení jako v tomto příkladu. Analogicky se dává ethanolová směs. Po 72 hodinách fermentace se proces ukončí. Produkce L-lysinu činí 21 až 26 g/litr fermentačního média.

P ř í k l a d 3

Kmenem Corynebacterium glutamicum, dependentním na homoserin a leucin a rezistentním k analogu isoleucinu, aminomethylthiomásečné kyselině, se zaočkuje 60 ml inokulačního média umístěného v 500 ml varné baňce, stejného složení jako v příkladu 1 a dále se kultivuje za

stejných podmínek jako v tomto příkladu. Obdobně se vede fermentace ve 21 laboratorních dvou-litrových tancích, rovněž i dávkování ethanolové směsi. Produkce L-lysinu po 72 hodinách fermentace činí 19 až 21 g/litr.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob fermentační přípravy L-lysinu kultivací kmenů *Corynebacterium* produkujících L-lysin, v tekuté živné půdě obsahující na počátku fermentace jako hlavní zdroj uhlíku soli kyseliny octové, komplexní zdroje dusíku a minerální živné soli, vyznačující se tím, že se kultivují kmeny *Corynebacterium glutamicum*, dependentní na homoserin a leucin a rezistentní k S-aminomethylthiomásečné kyselině, přičemž se v průběhu fermentace přidává do půdy po dosažení hodnoty pH 7,8 až 8,0 ve více dávkách směs, obsahující 600 ml ethanolu, 100 ml kyseliny octové, 66 g sacharosy a vodu do objemu 1 000 ml, v takových časových intervalech, aby koncentrace ethanolu v půdě činila 0,60 až 0,75 % hmot. a hodnota pH 7,0 až 7,2, načež se po dosažení maxima produkce fermentace ukončí.