



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

216 762

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 25 04 81
(21) PV 3115-81

(51) Int. Cl.³

C 12 P 13/08

(40) Zveřejněno 29 01 82
(45) Vydáno 01 10 84

(75)

Autor vynálezu SMĚKAL FRANTIŠEK RNDr.CSc., BULANT VLADIMÍR PhMr., PÍRKO JAROMÍR ing.,
GRUNT ZDENĚK ing., ROUŠAL VLASTIMIL ing., PRAHA

(54) Způsob fermentační přípravy L-lysinu

Vynález se týká způsobu fermentační přípravy L-lysinu kultivací produkčních mikroorganismů *Brevibacterium flavum* nebo *Corynebacterium*, za submerzních podmínek, s použitím kyselého hydrolyzátu odpadních zemědělských surovin nebo sušeného mléka nebo krmného droždí jako zdroje esenciálních aminokyselin, nezbytných pro růst mikroorganismu.

Vynález se týká způsobu fermentační přípravy L-lysinu, a to kultivací produkčních mikroorganismů kmenů *Brevibacterium flavum* nebo *Corynebacterium glutamicum* v tekuté živné půdě obsahující zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, minerální živné soli, vitaminy a další biofaktory, za submerzních podmínek.

Fermentační příprava L-lysinu pomocí produkčních mutant *Brevibacterium flavum* a *Corynebacterium glutamicum* je známa z mnoha literárních údajů, zejména z pat. spisů, kde bylo popsáno použití různých médií, lišících se většinou jen kvantitativními poměry mezi uhlíkatou a dusíkatou složkou, které zabezpečují růst mikroorganismů. Tak je například popsán fermentační způsob přípravy L-lysinu pomocí kmenů *Corynebacterium glutamicum* s použitím hydrolyzátu extrahované bílkoviny sojové nebo arašidové mouky /americké pat.spisy č. 3 535 831 a 3 687 810/. Při dalším způsobu se používá jako komplexního zdroje dusíku tzv. NZ-aminu /švýcarský pat.spis č. 515 77/. Jako další vhodné komplexní zdroje dusíku jsou uváděny například krevní moučka, odpady po zpracování masa, rybí moučka apod./americký pat. spis č. 3 595 751; australský pat. spis č. 432 304/. Produkční kmeny mikroorganismů *flavum* a *Corynebacterium glutamicum* jsou většinou auxotrofní mutanty, vyžadující k růstu homoserin nebo threonin a methionin, některé leucin, a dále se vyznačují rezistencí k analogům aminokyselin, jak je charakteristické pro regulační mutanty. Proto jako zdroj aminokyselin, nezbytných pro růst mikroorganismů, byl výhradně používán hydrolyzát komplexního zdroje dusíku, představovaného arašidovou moukou. Tato surovina je z ekonomického hlediska málo výhodná a proto se objevovaly snahy nahradit ji surovinou nebo surovinami levnějšími a snadno dostupnými.

Výhodný, snadno dostupný a levný komplexní zdroj asimilovatelného dusíku byl nalezen v hydrolyzátech různých odpadních zemědělských surovin rostlinného původu, jako jsou šroty olejní například řepkový, bavlníkový nebo lněný, popřípadě výrobků potravinářského průmyslu, jako je sušené odtučněné mléko nebo krmné droždí. Tyto suroviny se zpracovávají takto: ke 450 g výchozího materiálu se přidá 600 ml vody a 60 ml konc. kyseliny sírové, rozmíchá se a směs se nechá stát při teplotě místnosti 6 až 8 h. Potom se tato směs zehřívá v uzavřené nádobě 3 až 4 h na 120 °C, po vychladnutí se zfiltruje a ve filtrátu se stanoví obsah celkového dusíku, který činí 7 až 8 % hmotn. V této formě se hydrolyzát používá jako součást fermentačních půd, jako komplexní zdroj dusíku.

V následující tabulce jsou uvedena množství threoninu a methioninu v různých typech hydrolyzátů, získaných výše popsaným postupem /v mg/ml hydrolyzátu/:

Amino- kyselina	Řepkový šrot	Bavlníkový šrot	Krmné droždí	Lněný šrot	Arašidová mouka	Sušené mléko
threonin	1,31	0,74	0,83	0,90	0,70	0,83
methionin	0,76	0,74	0,44	0,52	0,57	1,34
Celkem	2,07	1,48	1,27	1,42	1,27	2,17

Popsané suroviny jsou uvedeny pouze jako příklad bez limitujícího významu. Jsou samozřejmě použitelné i další, pokud jejich hydrolyzáty, připravené výše popsaným způsobem, svými vlastnostmi vyhovují požadavkům pro komplexní zdroj dusíku a pokud se neprojevuje nějaký nepříznivý vliv na průběh fermentace a na dosažené výtěžky L-lysinu.

Předmětem vynálezu je tedy způsob fermentační přípravy L-lysinu kultivací produkčních mikroorganismů kmenů *Brevibacterium flavum* nebo *Corynebacterium glutamicum* v tekuté živné půdě

obsahující zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, minerální živné soli, vitaminy a další biofaktory, za submerzních podmínek, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se kultivace provádí v živné půdě, obsahující jako zdroj esenciálních aminokyselin, nezbytných pro růst mikroorganismu, kyselý hydrolyzát odpadních zemědělských surovin rostlinného původu, jako jsou šroty olejnin, zejména řepkový, bavlníkový nebo lněný šrot, nebo výrobků potravinářského průmyslu, zejména sušeného odtučněného mléka nebo krmného droždí, obsahující 7 až 8 % hmotn. celkového dusíku, v množství 10 až 30 % obj., vztaženo na objem živné půdy.

Jak vyplývá z údajů v uvedené tabulce, jsou hydrolyzáty z jednotlivých surovin více než rovnocennými zdroji threoninu a methioninu ve srovnání se standardně užívaným hydrolyzátem arašidové mouky. Rovněž výtěžky L-lysinu, samozřejmě v závislosti na použitém produkčním kmeni, jsou uspokojující, bez větších výkyvů.

Způsob podle vynálezu představuje tedy významnou ekonomizaci fermentační výroby L-lysinu. Bližší podrobnosti vyplývají z příkladů podle vynálezu, které způsob pouze ilustrují, ale nijak neomezuji.

Příklad 1

Produkčním kmenem *Brevibacterium flavum*, který vyžaduje k růstu homoserin a který je rezistentní vůči S-aminoethyl-L-cysteinu, se zaočkuje 50 ml inokulačního média, umístěného v 500 ml varné baňce, jež má toto složení: sacharosa techn. 30 g, octan sodný kryst. 20 g, kukuřičný extrakt /60 % hmotn. sušiny/ 30 g, voda do 1000 ml. Po zaočkování se dále kultivuje na rotační třepačce /240 ot/min/ při teplotě 29 °C po dobu 18 až 24 h. Vyrostlou kulturou se v množství 10 % obj. zaočkuje 20 ml fermentačního média, umístěného v 500 ml varné baňce, jež má toto složení: sacharosa techn. 180 g, hydrolyzát bavlníkové mouky nebo šrotu 200 ml, kukuřičný extrakt /60 % hmotn. sušiny/ 10 g, síran amonný kryst. 1 g, fosforečnan draselný sek. 1 g, síran hořečnatý kryst. 0,1 g, uhličitán vápenatý mletý 30 g, voda do 1000 ml; pH média po sterilizaci 6,8 až 7,0. Kultivace probíhá dále na rotační třepačce při 29 °C, po dobu 96 až 120 h. V průběhu kultivace se pH kultury upravuje pomocí 10 % obj. roztoku čpavku na hodnotu kolem 7,0. Po ukončení kultivace činí produkce L-lysinu u kmene *Brevibacterium flavum* 36 až 42 g/litr média; u kmenů *Corynebacterium glutamicum* činí za stejných podmínek produkce L-lysinu 36 až 38 g/litr média.

Příklad 2

Stejně jako v příkladu 1 se inokulem produkčního kmene *Brevibacterium flavum* zaočkuje medium stejného složení jako v příkladu 1, jen s tím rozdílem, že jako komplexního zdroje dusíku se použije hydrolyzáta řepkového šrotu, a to ve stejném množství jako u bavlníkového hydrolyzáta. Za fermentačních podmínek jako v příkladu 1 se po 96 až 120 h dosáhne produkce L-lysinu 37 až 43 g/litr média; při aplikaci produkčních kmenů *Corynebacterium glutamicum* se za stejných podmínek a za stejnou dobu fermentace dosáhne produkce L-lysinu 40 až 45 g/litr média.

Příklad 3

Stejně jako v příkladu 1 se inokulem produkčního kmene *Brevibacterium flavum* zaočkuje fermentační medium stejného složení jako v příkladu 1, jen s tím rozdílem, že se jako komplexního zdroje dusíku použije hydrolyzáta lněného šrotu v množství 20 % obj. Za fermentačních podmínek jako v příkladu 1 se po 96 až 120 h kultivace dosáhne produkce L-lysinu 40 až 45 g/litr média; při aplikaci produkčních kmenů *Corynebacterium glutamicum* se dosáhne produkce L-lysinu 42 až 45 g/litr média.

Příklad 4

Stejně jako v příkladu 1 se inokulem produkčního kmene *Brevibacterium flavum* zaočkuje fermentační medium stejného složení jako v příkladu 1, jen s tím rozdílem, že jako komplexního zdroje dusíku se použije hydrolyzátu odtučněného sušeného mléka v množství 20 % obj. Za fermentačních podmínek jako v příkladu 1 se po 96 h kultivace dosáhne produkce L-lysinu kolem 27 g/litr media; u kmene *Corynebacterium glutamicum* činí produkce 28 až 30 g L-lysinu/litr media.

Příklad 5

Stejně jako v příkladu 1 se inokulem produkčního kmene *Brevibacterium flavum* zaočkuje fermentační medium stejného složení jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že se jako komplexního zdroje dusíku použije hydrolyzátu krmného droždí v množství 20 % obj. Za fermentačních podmínek jako v příkladu 1 se po 96 h kultivace dosáhne produkce L-lysinu kolem 20 g/litr media; u produkčních kmenů *Corynebacterium glutamicum* se produkce L-lysinu pohybuje mezi 40 až 44 g/litr media za stejnou dobu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob fermentační přípravy L-lysinu kultivací produkčních mikroorganismů kmenů *Brevibacterium flavum* nebo *Corynebacterium glutamicum* v tekuté živné půdě obsahující zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, minerální živné soli, vitaminy a další biofaktory, za submerzních podmínek, vyznačující se tím, že se kultivace provádí v živné půdě, obsahující jako zdroj esenciálních aminokyselin, nezbytných pro růst mikroorganismu, kyselý hydrolyzátní odpadních zemědělských surovin rostlinného původu, jako jsou šroty olejnin, zejména řepkový, bevlíkový nebo lněný šrot, nebo výrobků potravinářského průmyslu, zejména sušeného odtučněného mléka nebo krmného droždí, obsahující 7 až 8 % hmotnostních celkového dusíku, v množství 10 až 30 % obj., vztaženo na objem živné půdy.