

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

O P I S P A T E N T O W Y 94291

PATENTU TYMCZASOWEGO

Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 07.08.75 (P. 182621)

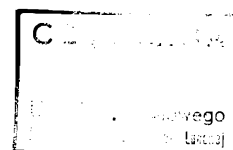
Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 14.08.76

Opis patentowy opublikowano: 31.12.1977

MKP C12d 13/06

Int. Cl.² C12D 13/06



Twórcy wynalazku: Marian Tyc, Danuta Kotiuszko, Krystyna Wituch,
Halina Morawska

Uprawniony z patentu tymczasowego: Instytut Przemysłu Farmaceutycznego,
Warszawa (Polska)

Sposób wytwarzania L-lizyny

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania L-lizyny na drodze fermentacji głębinowej.

Znanych jest wiele sposobów wytwarzania L-lizyny przy użyciu drobnoustrojów, należących do różnych gatunków, na pożywkach, zawierających przyswajalne źródło azotu i węgla. Szczególną zdolnością wytwarzania L-lizyny odznaczają się mutanty auktotroficzne, takie jak np. *Micrococcus glutamicus* ATCC 13287 i *Brevibacterium flavum* ATCC 21129. Otrzymywanie wysokich wydajności L-lizyny nie tylko zależy od aktywności szczepu, lecz również od składników pożywki produkcyjnej zapewniających właściwy wzrost drobnoustroju-producenta i równocześnie stymulujących wytwarzanie pożądanego aminokwasu. W produkcji L-lizyny podstawowym warunkiem uzyskania wysokich wydajności jest dobór odpowiedniego źródła azotu pochodzenia naturalnego.

Dotychczas wysokie wydajności L-lizyny otrzymywano na pożywkach, zawierających jako źródło azotu pochodzenia naturalnego hydrolizaty mąki sojowej i mąki arachidowej. Zarówno substrat, jak i sam proces hydrolizy, który prowadzi się w 120°C w środowisku 6n H₂SO₄, są stosunkowo drogie. Ponadto mąka sojowa i arachidowa są produktami importowanymi.

W sposobie według wynalazku hydrolizaty mąki sojowej i arachidowej zastępuje się łatwo dostępnym sokiem komórkowym ziemniaka, który jako źródło azotu pochodzenia naturalnego nie ustępuje pod względem wartości produkcyjnej wymienionym hydrolizatom. Na pożywkach z sokiem ziemniaczanym uzyskuje się wydajności L-lizyny co najmniej tego samego rzędu, co na pożywkach z hydrolizatami mąki sojowej lub arachidowej.

Sok komórkowy ziemniaka dostępny jest w kraju w olbrzymich ilościach. Przy produkcji krochmalu 75% przerabianych ziemniaków stanowi sok komórkowy, który jako produkt odpadowy zaliczany jest do uciążliwych ścieków. Wody ściekowe z krochmalni w pewnej części wykorzystywane są w rolnictwie do nawadniania roli i łąk. Pozbywanie się w ten sposób uciążliwych ścieków ma jednak ograniczony zasięg. Tereny nawadniane muszą być dokładnie zniwelowane i ilość doprowadzonych wód ściekowych z krochmalni dokładnie obliczona. Istnieje bowiem niebezpieczeństwo szkodliwego przesylenia ziemi substancjami soku ziemniaczanego a tym samym zanieczyszczania naturalnego środowiska człowieka.

Wykorzystanie z wielkotonażowej produkcji L-lizyny soku ziemniaczanego otwiera olbrzymie perspektywy użycia uciążliwych ścieków przemysłowych i prowadzi do uzyskania dużych efektów ekonomicznych, wynikających z zamiany ścieków na cenny, mający szerokie zastosowanie egzogeny aminokwas, L-lizynę.

Skład chemiczny nierozcieńczonego soku ziemniaczanego waha się w następujących granicach: sucha masa 5,38–6,1% w tym: cukry redukujące około 2,15% azot ogólny 1,65–1,95% azot aminowy około 0,08% popiół około 0,9%. Obok białka, resztę substancji azotowych stanowią peptony 13,4% aminokwasy 22,3%, amidy 12,3% i związki amonowe 2,8%. Z aminokwasów w soku ziemniaczanym w większych ilościach występują: kwas asparaginowy i glutaminowy, walina, arginina i tyrozyna, a w mniejszych: lizyna, leucyna, metionina, treonina, fenyloalanina i tryptofan. Z węglowodanów występują w soku ziemniaczanym: skrobia, glukoza, sacharoza i galaktoza, a ze związków nieorganicznych większość bardzo wartościowych mikroelementów. Ponadto sok ziemniaczany zawiera witaminy A, B₁, B₂, B₆, PP, C, enzymy i kwasy organiczne.

Z powyższej analizy wynika, że sok ziemniaczany zawiera wartościowe składniki dla rozwoju szczepu produkującego i dla wytwarzania L-lizyny.

Według wynalazku biosyntezę L-lizyny prowadzi się przy użyciu mutantów drobnoustrojów z blokami genetycznymi, sprzyjającymi wytwarzaniu L-lizyny, takich jak np. *Micrococcus glutamicus* ATCC 13287, na pożywkach, zawierających jako źródło azotu pochodzenia naturalnego sok komórkowy ziemniaka, otrzymywany przy produkcji krochmalu oraz przyswajalne źródła węgla i sole mineralne, w temperaturze poniżej 40°C, przy równoczesnym mieszaniu i napowietrzaniu w czasie, potrzebnym do wytworzenia L-lizyny z której przygotowuje się znanymi sposobami preparaty do celów leczniczych, spożywczych i paszowych.

Zaletą sposobu według wynalazku jest to, że pożywka produkcyjna jest prosta i tania. Składa się ona z soku ziemniaczanego, wzbogaconego tanimi źródłami węgla i solami mineralnymi. Spośród źródeł węgla stosuje się rozpuszczalne węglowodany np. glukozę techniczną sacharozę, melasę i inne cukry proste oraz ich mieszaniny. Jako źródło węgla stosuje się również alkohole, np. etanol, metanol, oraz kwasy organiczne i ich sole, np. kwas octowy i/lub octan sodu. Spośród soli mineralnych korzystny jest dodatek soli amonowych.

L-lizyna, wytworzona w pożywkach, zawierających sok komórkowy ziemniaka, jest szczególnie dogodnym substratem do otrzymywania preparatów paszowych L-lizyny przez suszenie całej hodowli w suszarce rozpyłowej. Metoda ta jest prosta, nie daje ścieków i odpadów, a otrzymane preparaty oprócz lizyny zawierają witaminy, różne aminokwasy i sole mineralne, wytworzone w czasie biosyntezy L-lizyny.

Dalsze szczegóły sposobu według wynalazku znajdują się w przykładzie, który służy do objaśnienia, nie ograniczając wynalazku.

P r z y k ł a d. Hodowla na pożywce stałej.

Szczep bakterii *Micrococcus glutamicus* ATCC 13287 hoduje się na skosie agarowym o następującym składzie: pepton-Protease – 1,0% NaCl – 0,5%, wyciąg wołowy – 0,22%, glukoza – 1,0%, agar – 2,0%, woda destylowana – do 100%. Przed sterylizacją koryguje się pH do wartości 7,4. Sterylizację pożywki agarowej prowadzi się w temperaturze 117°C przez 30 minut. Agary skośne szczepi się komórkami bakterii, pobranymi oczkiem z 48 godzinnej hodowli, przechowywanej w chłodni w temperaturze +4°C. Zaszczepione agary skośne umieszcza się w termostacie o temperaturze 28°C na 48 godzin. Komórki bakterii zmywa się z hodowli agarowej 2 ml 0,85% roztworu NaCl w wodzie. Otrzymaną zawiesinę komórek szczepi się pożywką posiewową w kolbach. Hodowla na pożywce posiewowej. Hodowlę posiewową szczepu bakterii *Micrococcus glutamicus* ATCC 13287 prowadzi się w kolbach stożkowych o objętości 500 ml zawierających po 50 ml pożywki posiewowej o następującym składzie: melasa – 4,0%, WNK (50 sm) – 1,0%, (NH₄)₂SO₄ – 1,5%, drożdże suszone pastewne – 0,25%, CaCO₃ techniczny 0,5% woda wodociągowa – do 100%. Przed sterylizacją koryguje się pH pożywki do wartości 7,2. Sterylizację prowadzi się w temperaturze 117°C przez 30 minut. Tak przygotowaną pożywkę posiewową szczepi się zawiesiną komórek z hodowli na pożywce stałej w ilości 0,2 ml zawiesiny na 50 ml pożywki. Hodowlę posiewową prowadzi się przez 24 godziny na trzęsawce obrotowej o 220 obr/minutę, umieszczonej w termostacie o temperaturze 28°C.

Hodowla na pożywce produkcyjnej.

Hodowlę produkcyjną szczepu bakterii *Micrococcus glutamicus* ATCC 13287 prowadzi się w kolbach stożkowych o 500 ml z łamaczami i wydłużoną szyjką, zawierających 30 ml pożywki o następującym składzie: CaCO₃ techn. – 2,0% (NH₄)₂SO₄ – 4,0%, melasa buraczana – 30%, sok ziemniaczany – do 100%. Melasę buraczaną wyjąławia się oddzielnie. Roztwór pozostałych składników pożywki wyjąławia się w temperaturze 117°C przez 30 minut. Po sterylizacji pożywkę uzupełnia się melasą i szczepi hodowlą posiewową w ilości 5%. Hodowlę produkcyjną prowadzi się przez 48–96 godzin na trzęsawce obrotowej o 220 obr/minutę, umieszczonej w termostacie o temperaturze 30°C. Po zakończeniu procesu biosyntezy hodowla zawiera 37000–41000 mcg L-lizyny w 1 ml.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania L-lizyny na drodze fermentacji głębinowej przy zastosowaniu mutantów drobnoustrojów z blokami genetycznymi, sprzyjającymi wytwarzaniu L-lizyny, takich jak *Micrococcus glutamicus* ATCC 13287, na pożywkach, zawierających przyswajalne źródła azotu i węgla oraz sole mineralne, z n a m i e n n y t y m, że stosuje się pożywkę produkcyjną zawierającą jako źródło azotu pochodzenia naturalnego sok komórkowy ziemniaka, otrzymywany jako produkt odpadowy przy produkcji krochmalu oraz przyswajalne źródła węgla i sole mineralne, w temperaturze poniżej 40°C, przy równoczesnym mieszaniu i napowietrzaniu, w czasie potrzebnym do wytwarzania L-lizyny.