



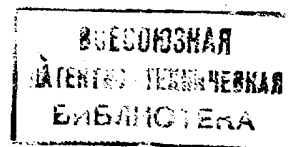
СОЮЗ СОВЕТСКИХ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ  
РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 974817 A1

(51)5 C 12 P 13/08

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ  
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ  
ПРИ ГИИТ СССР

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ



(21) 3302278/28-13

(22) 16.06.81

(46) 23.08.90. Бюл. № 31

(71) Всесоюзный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов

(72) В.А.Лившиц, А.К.Соколов, Т.А.Бачина, В.Г.Дебабов, Н.И.Жданова, Ю.И.Козлов, А.В.Беларева, М.М.Гусятинер, Е.М.Хургес, М.А.Гулько, Г.Х.Тевелев, Т.М.Позднякова, Н.А.Горячева, В.Н.Мошенцева, Б.А.Ребентис, А.Ф.Шолин и Н.К.Янковский

(53) 668.394 (088.8)

(56) Авторское свидетельство СССР № 904325, кл. С 12 D 13/06, 1980.

(54)(57) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ L-ТРЕОНИНА, предусматривающий приготовление посевного материала путем выращивания про-

2  
дуцирующих его микроорганизмов вида *Escherichia coli* в жидкой среде в присутствии гидролизата или автолизата белоксодержащего субстрата и пенициллина, введение посевного материала в ферментативную среду, содержащую источники углерода, азота и минеральные соли, ферментацию в глубинных условиях с последующей обработкой культуральной жидкости и выделением целевого продукта, отличающийся тем, что, с целью повышения выхода треонина, снижения продолжительности ферментации при одновременном уменьшении расхода сырья, при приготовлении посевного материала из вида *Escherichia coli* используют штамм *Escherichia coli* ВНИИ генетика 472 Т-23, выращивание которого осуществляют при pH 6,5-7,5 путем дробного введения в посевную среду аммиачной воды.

Изобретение относится к микробиологической промышленности, а именно к способу получения незаменимой аминокислоты - L-треонина, применяемой в качестве компонента различных питательных смесей медицинского назначения, добавки в пищу человека и в корм животных, а также как реактив для фармацевтической и химической промышленности и как ростовой фактор для микроорганизмов, продуцирующих другие аминокислоты, например L-лизин, L-гомосерин.

Известен способ получения L-треонина с использованием штамма *Escherichia coli* ВНИИгенетика 472 Т, способного усваивать сахарозу и устойчивого к треонину и гомосерину. Способ предусматривает при культивировании плазмидного продуцента выращивание посевного материала на жидкой посевной среде с последующим введением посевного материала в ферментационную среду. На стадии выращивания посевного материала в посевную среду вносят источники углерода, азота, минераль-

(19) SU (11) 974817 A1

ные соли, мел, а также гидролизат белоксодержащих субстратов и пенициллина.

После глубокой ферментации культуральную жидкость обрабатывают и выделяют целевой продукт.

В известном способе при культивировании плазмидного продуцента треонина значение pH к концу выращивания посевного материала снижается до 5,0-5,5. При внесении посевного материала с низким значением pH в ферментационную среду, которая имеет нейтральное значение pH, происходит задержка начала развития культуры на несколько часов, связанная с адаптацией культуры к новым условиям культивирования, что приводит к увеличению продолжительности ферментации. Максимальное накопление L-треонина (до 32 г/л) достигается за 55 ч ферментации. При этом на синтез 1 г аминокислоты расходуется 4 г углеводов.

Недостатками указанного метода получения L-треонина являются недостаточно высокий уровень накопления L-треонина и большая продолжительность ферментации.

Целью предлагаемого изобретения является повышение уровня накопления треонина в культуральной жидкости и сокращение продолжительности ферментации при одновременном уменьшении расхода углеводов на синтез аминокислоты.

Поставленная цель достигается тем, что в способе получения L-треонина, предусматривающем приготовление посевного материала путем выращивания продуцирующих его микроорганизмов вида *Escherichia coli* в жидкой среде в присутствии гидролизата или автолизата белоксодержащего субстрата и пенициллина, введение посевного материала в ферментационную среду, содержащую источники углерода, азота и минеральные соли, ферментацию в глубоких условиях с последующей обработкой культуральной жидкости и выделением целевого продукта, предложено согласно изобретению при приготовлении посевного материала из вида *Escherichia coli* использовать штамм *Escherichia coli* ВНИИгенетика 472 Т-23, выращивание которого осуществляют при pH 6,5-7,5 путем дробного введения в посевную среду аммиачной воды.

Способ позволяет получить до 55 г/л L-треонина за 40 ч ферментации при минимальном расходе углеводов до 2,5 г на 1 г треонина.

Штамм *E. coli* ВНИИгенетика 472 Т-23 депонирован в Центральном музее промышленных микроорганизмов и имеет регистрационный номер ЦМП В-2307. Штамм *E. coli* ВНИИгенетика 472 Т-23 и штамм-прототип *E. coli* ВНИИгенетика 472 Т имеют общего предшественника - штамм *E. coli* ВНИИгенетика 472, который получен введением детерминантов и сбраживания сахарозы в клетки штамма *E. coli* ВНИИгенетика М-1, и являются мутантами этого штамма, устойчивыми к треонину и гомосерину при их содержании в среде более 0,5 г/л. Штамм *E. coli* ВНИИгенетика 472 Т-23 отличается от штамма *E. coli* ВНИИгенетика 472 Т стабильным сохранением признака устойчивости к указанным аминокислотам и более стабильным сохранением плазмиды в процессе культивирования на обогащенных питательных средах, а также более высокой удельной продуктивностью (см. табл.1).

Штамм *E. coli* ВНИИгенетика 472 Т-23 имеет следующую культурально-морфологическую характеристику.

Морфология. Грамотрицательные слабоподвижные тонкие палочки с закругленными концами размером 1,5-2 мкм в длину.

Культурально-физиологические признаки. Мясо-пептонный агар. Через 24 ч роста при 37°C образует круглые беловатые полупрозрачные колонии диаметром 1,5-3 мм, поверхность колонии гладкая, края ровные или слегка волнистые, центр колонии слегка приподнят, структура однородная, консистенция пастообразная, легко эмульгируются.

Рост на агаризованной минимальной среде Адамса. Через 40-48 ч роста при 37°C образует колонии 0,5-1,5 мм в диаметре, серовато-белые, полупрозрачные слегка с блестящей поверхностью, ослизняющиеся через 4-5 суток.

Рост в мясо-пептонном бульоне. После 24 ч роста при 37°C наблюдается сильное равномерное помутнение, небольшой осадок, запах характерный.

Рост в жидкой минимальной среде Адамса. Через двое суток роста с аэрацией при 37°C наблюдается сильное

мере необходимости. На 27 часу ферментации концентрация треонина в культуральной жидкости достигает 48 г/л, на 40 часу - 55 г/л. Расход сахара на 1 г треонина на конец ферментации составляет 2,5 г.

Для выделения треонина 400 мл культуральной жидкости нагревают в течение 5 мин до температуры 100°C, затем биомассу отделяют центрифугированием. Полученный нативный раствор упаривают под вакуумом до 80 мл, добавляют к нему 20 мл этанола и кристаллизуют 7 ч при температуре 0°C. Кристаллы фильтруют и сушат. Получают 15,4 г L-треонина.

**Пример 2.** Продукт треонина и условия выращивания посевного материала те же, что и в примере 1. Отличие состоит в том, что значение pH в ходе выращивания посевного материала поддерживают на уровне 6,5. Через 24 ч культивирования посевной материал с титром клеток  $1 \cdot 10^{10}$  (доля клеток, утративших плазмиду, не более 6%) в количестве 10% вносят в ферментационную среду следующего состава, %:

Глюкоза	2
Аммоний сернокислый	0,5
Калий фосфорнокислый однозамещенный	0,1

Ферментацию ведут в тех же условиях, что и в примере 1, с тем отличием, что в качестве pH-стабилизирующего агента используют питательную добавку, состоящую из смеси 40% раствора глюкозы и 25% водного раствора аммиака в соотношении 6:1 (по объемам). Через 40 ч ферментации накопление треонина составляет 41 г/л. Расход глюкозы на 1 г синтезированного треонина составляет 3,1 г.

Для выделения L-треонина 400 мл культуральной жидкости нагревают в течение 20 мин до 60°C, затем биомассу отделяют центрифугированием. Полученный нативный раствор пропускают через колонку со смолой КУ-2-8 в H<sup>+</sup> форме. Сорбированный треонин элюируют 3%-ным раствором аммиака, упаривают до содержания сухих веществ 80%, добавляют этанол в количестве 1/3 от объема упаренного аллюата и кристаллизуют в течение 12 ч при температуре 0 - (+5)°C. Кристаллы L-треонина отфильтровывают, промывают и сушат. Получают 15 г L-треонина (выход сос-

тавляет 92%). Анализ чистоты продукта методом тонкослойной хроматографии (10 мкг) показывает отсутствие других аминокислот.

**Пример 3.** Продукт треонина и условия выращивания посевного материала те же, что и в примере 1. Отличие состоит в том, что в качестве питательной добавки в посевную среду вместо автолизата дрожжей вносят гидролизат БВК в количестве 0,1% (в расчете на исходный БВК). Посевной материал выращивают в условиях pH-стабилизации при pH  $7,5 \pm 0,1$  в течение 24 ч. Титр клеток в готовом посевном материале  $0,9 \cdot 10^{10}$  кл/мл (доля клеток, утративших плазмиду, не более 8%). Посевной материал в количестве 10% используют для засева ферментационной среды следующего состава, %:

Сахароза	8
Аммоний сернокислый	0,5
Калий фосфорнокислый однозамещенный	0,1

Ферментацию ведут в тех же условиях, что и в примере 1. Через 13 ч культивирования, когда концентрация углевода в среде снижается до 5%, в ферментационную среду вносят дополнительно еще 4% сахарозы. К 30 часам ферментации сахар утилизируется полностью и накопление треонина составляет 39 г/л. На синтез 1 г треонина расходуется 3,0 г сахарозы.

Для выделения L-треонина культуральную жидкость обрабатывают также, как в примере 1. Полученный нативный раствор упаривают до содержания сухих веществ 30% и кристаллизуют при охлаждении (+3-5°C). Получают технический препарат L-треонина с содержанием основного вещества 90%. Выход продукта составляет 75%.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет снизить продолжительность ферментации до 30-40 ч по сравнению с 30-55 ч по известному способу. При этом выход составляет 39-55 г/л L-треонина (в известном способе максимальный выход, достигаемый за 55 ч ферментации, составляет 32 г/л). Минимальный расход углеводов на синтез 1 г L-треонина составляет 2,5 г, что на 40% ниже, чем в известном, в котором на синтез 1 г аминокислоты расходуется 4 г углеводов.

равномерное помутнение, запах характерный.

Рост по уколу в мясо-пептонном агаре. Хороший рост по всему уколу.

Рост на желатине. Желатину не разжижает.

Рост на молоке. Хороший рост с коагуляцией молока.

Образование индола. Индол образуется.

Рост на различных углеводах. Хорошо растет на сахарозе, глюкозе, лактозе, маннозе, галактозе, ксилозе, фруктозе, глицероле, маннитоле с образованием кислоты и газа.

Отношение к антибиотикам. Устойчив к пенициллину.

Патогенность. Не патогенен.

Содержание плазмид. Клетки содержат многокопийную плазмиду pYN<sub>7</sub> (мол.вес 5.8 мегадальтон), обеспечивающую устойчивость бактерий к пенициллину и несущую гены треонинового оперона.

Способ осуществляют следующим образом.

Клетки продуцента *E. coli* ВНИИгенетика 472-Т-23 выращивают на агаризованной минимальной питательной среде в присутствии пенициллина, затем суспензией клеток, смытых со скошенного агара, засевают жидкую питательную посевную среду, содержащую источники углерода, азота, необходимые минеральные соли, питательную добавку в виде гидролизатов белоксодержащих субстратов и пенициллин. Посевной материал выращивают в ферментере, оснащенной системой рН-статирования, при температуре 35-37°C и непрерывном аэрировании и перемешивании в течение 20-30 ч. Значение рН в ходе выращивания посевного материала поддерживают на уровне 6,5-7,5 дробным введением в ферментер аммиачной воды. Приготовленный таким образом посевной материал используют для засева ферментационной среды, содержащей источники углерода (например сахар или глюкозу), источники азота и необходимые минеральные соли. Ферментацию осуществляют в ферментерах, оснащенных системой рН-статирования, при рН 6,5-7,5, температуре 35-37°C и непрерывном перемешивании и аэрировании. В качестве рН-статирующего агента применяют либо аммиачную воду, либо сбалансированную по углероду и аммиаку подпитку.

Продолжительность ферментации 30-40 ч. На 40 ч культивирования в культуральной жидкости накапливается до 55 г/л треонина. Для выделения треонина культуральную жидкость подвергают быстрому нагреву в течение не более 20 мин до температуры 60-100°C, с целью предупреждения лизиса клеток, затем биомассу отделяют центрифугированием или сепарированием. Выделение треонина из полученного нативного раствора осуществляют одним из известных способов.

Способ поясняется следующими примерами.

Пример 1. Культуру продуцента *E. coli* ВНИИгенетика 472 Т-23, выращенную на агаризованной минимальной среде с глюкозой в присутствии пенициллина, пересевают на жидкую посевную питательную среду следующего состава, %:

Сахар технический	4
Аммоний сернокислый	0,5
Калий фосфорнокислый двузамещенный	0,2
Магний сернокислый	0,04
Автолизат дрожжей	0,2
Пенициллин	0,01

Доза засева  $1 \cdot 10^5$  клеток в мл.

Выращивание посевного материала проводят в ферментере емкостью 0,5 л при аэрировании 0,5 л воздуха в минуту, перемешивании 900 об/мин, температуре 37°C. рН-статирование осуществляют на уровне  $7,0 \pm 0,1$  путем автоматической подачи в ферментер аммиачной воды. Время выращивания посевного материала 20 ч. Титр клеток в готовом посевном материале  $1 \cdot 10^{10}$  кл/мл (доля клеток, утративших плазмиду, не более 6%). Посевной материал в количестве 10% вносят в ферментационную среду следующего состава, %:

Сахар технический	8
Аммоний сернокислый	0,5
Калий фосфорнокислый однозамещенный	0,1

Ферментацию проводят в ферментере с рабочим объемом 0,5 л, оборудованном системой рН-статирования. Режим ферментации: аэрирование 0,5 л/мин, перемешивание 900 об/мин, температура 37°C, рН-статирование на уровне  $7,0 \pm 0,1$  путем подачи аммиачной воды. После исчерпания из ферментационной среды начальной порции сахара его вносят дробно в несколько порций, по

Сравнительная характеристика штаммов  
E.coli ВНИИгенетика 472 Т и 472 Т-23

Штамм	Относительное содержание клеток, сохраняющих после 10 генераций на бульоне Хоттингера, устойчивость, к		Максимальная удельная продуктивность г треонина г биомассы в ч
	треонину и гомосерину, %	пенициллину, %	
ВНИИгенетика 472 Т	1-3	82-98	0,14
ВНИИгенетика 472 Т-23	100	98-99	0,23

Редактор Е.Мисропова Техред М.Дидык

Корректор Т.Малец

Заказ 3086

Тираж 490

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР  
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г.Ужгород, ул. Гагарина, 101