รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

Escherichia coli ที่สร้าง L-อาร์จินีน และ วิธีการการผลิต L-อาร์จินีน

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

สาขาวิทยาศาสตร์เกี่ยวข้องกับ *Escherichia coli* ที่สร้าง L-อาร์จินีน และ วิธีการการผลิต L-อาร์จินีนโดยการหมักโดยใช้ *Escherichia coli* L-อาร์จินีนเป็นกรดอะมิโนที่มีประโยชน์ทางอุตสาหกรรมเป็นสารตัวประกอบของสารกระตุ้นการทำหน้าที่ตับ, การให้กรดอะมิโนฉีด, สิ่งเตรียมเสริมกรดอะมิโน และ ที่คล้ายกัน

ภูมิหลังของศิลปะและวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

เป็นที่รู้จักอยู่แล้วว่าตัวกลายพันธุ์บางตัวของ *Escherichia coli* ที่ทนทานตัวเหมือนของอาร์จินีน และ ไพริมิดีนที่สร้างอาร์จินีน(Pierard A. และ Glansdorf N., *Mol. Gen. Genet.,118, 235,* 1972 และ Glansdorf N.,การสังเคราะห์ชีวภาพของอาร์จินีน และ โพลีอะมีน ใน"*E. coli and Salm. thyphimurium,* 1996) รวมทั้งวิธีการสำหรับการผลิต L-อาร์จินีน โดยใช้ *E. coli* กลายพันธุ์ที่ทนทานต่อยาบางอย่าง หรือ สายพันธุ์ที่กลับมารวมตัวกันของ *E. coli* ที่ซึ่งยีนที่ถอดรหัสเอนไซม์ของวิถีทางการสังเคราะห์ชีวภาพอาร์จินีนถูกนำเข้าไปที่รู้จักกันอยู่แล้ว

วิถีทางการสังเคราะห์ชีวภาพอาร์จินีนของ *E. coli* K12 หนึ่งโมลของอะเซติล-CoA ถูกใช้ไป และ หนึ่งโมลของกรดอะเซติกถูกปล่อยออกมา เพื่อสร้างหนึ่งโมลของอาร์จินีน(รูปที่ 1) จากผลของผลพลอยได้อะเซเตท, ส่วนสำคัญของแหล่งคาร์บอนเป็นของเสีย, นอกจากนี้, การสะสมอยู่ของอะเซเตททำให้การเติบโตของตัวสร้างอาร์จินีนที่เพาะเลี้ยงแย่ลงไปอีก

มันเป็นที่รู้กันแล้วเช่นเดียวกันว่า *E.coli* ไม่สามารถใช้อะเซเตทเป็นแหล่งคาร์บอนได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

จากมุมมองข้างบน, ผู้ประดิษฐ์ได้คิดว่าการผลิตอาร์จินีนควรจะดีขึ้น, ถ้าสายพันธุ์ที่สร้างอาร์จินีนมีความสามารถนำกรดอะเซติกกลับมาใช้ใหม่ ตามที่กล่าวแล้วนั้น, วัตถุประสงค์หนึ่งของการประดิษฐ์นี้คือการหาสายพันธุ์ที่สร้างอาร์จินีนของ *E. coli* ที่ซึ่งใช้กรดอะเซติก และ วิธีการสำหรับการผลิตอาร์จินีนโดยใช้สายพันธุ์นั้น

เมื่อผู้ประดิษฐ์สร้างตัวกลายพันธุ์ของ *E. coli* ตัวสร้างอาร์จินีนซึ่งสามารถใช้กรดอะเซติก และ ประสบผลในการทำให้ผลการผลิตของ *E. coli* ตัวสร้างอาร์จินีนดีขึ้น ดังนั้น, การประดิษฐ์นี้ถูกทำให้เสร็จสมบูรณ์

นั่นคือ, การประดิษฐ์นี้ใช้ประกอบด้วย *E. coli* ที่ซึ่งมีความสามารถสร้างอาร์จินีน และ มีความสามารถใช้อะเซเตท

การประดิษฐ์นี้ใช้ประกอบต่อไปด้วยวิธีการของการผลิตอาร์จินีนที่ประกอบด้วยขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ *E. coli* ที่ซึ่งมีความสามารถใช้อะเซเตท และ มีความสามารถสร้างอาร์จินีน, ในตัวกลางเพาะเลี้ยงเพื่อผลิต และ สะสมอาร์จินีนในตัวกลาง, และ การเก็บรวมอาร์จินีนจากตัวกลางนั้น

ในการประดิษฐ์นี้, กรดอะมิโนเป็นของการจัดรูป L-

<u>คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ</u>

ไม่มี

<u>การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์</u>

การประดิษฐ์นี้จะถูกอธิบายในรายละเอียดข้างล่าง

E. coli ของการประดิษฐ์นี้มีความสามารถใช้อะเซเตท และ มีความสามารถสร้างอาร์จินีน สายพันธุ์ *E. coli* ที่มีความสามารถใช้อะเซเตท และ มีความสามารถสร้างอาร์จินีน อาจจะถูกทำให้ได้มาโดยการทำให้มีส่วนความสามารถสร้างอาร์จินีนที่สายพันธุ์ *E. coli* ที่มีความสามารถใช้อะเซเตท

สำหรับการประดิษฐ์นี้, คำว่า"ความสามารถสร้างอาร์จินีน" หมายถึงความสามารถของสายพันธุ์ *E. coli* ที่ถูกใช้สำหรับการประดิษฐ์นี้เพื่อผลิต และ สะสมอาร์จินีนในตัวกลาง เมื่อสายพันธุ์ *E. coli* ถูกเพาะเลี้ยงในตัวกลาง คำว่า"ความสามารถใช้อะเซเตท" หมายถึงความสามารถใช้กรดอะเซติก หรือ อะเซเตทได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าสายพันธุ์แม่, ตัวอย่างเช่น, ความสามารถของสายพันธุ์ *E. coli* ที่ถูกใช้สำหรับการประดิษฐ์นี้ที่เติบโตเร็วกว่าสายพันธุ์แม่เมื่อสายพันธุ์ *E. coli* ถูกเพาะเลี้ยงในตัวกลางที่มีกรดอะเซติก หรือ อะเซเตทอยู่เป็นแหล่งคาร์บอนตัวเดียว อย่างเป็นรูปธรรมมากกว่า, มันสามารถกล่าวได้ว่าสายพันธุ์ *E. coli* มีความสามารถใช้อะเซเตทถ้าสายพันธุ์นั้นเติบโตเร็วกว่า เมื่อสายพันธุ์นั้นถูกเพาะเลี้ยงในตัวกลางที่มีกรดอะเซติก หรือ อะเซเตทอยู่เป็นแหล่งคาร์บอนตัวเดียว, ตัวอย่างเช่น, ตัวกลางเหลวน้อยที่สุด A (อธิบายข้างล่าง) ที่มี 5 กรัม/ลิตร ของแอมโมเนียม อะเซเตทภายใต้สภาวะที่เหมาะสม อย่างเป็นรูปธรรมมากที่สุด, มันสามารถกล่าวได้ว่าสายพันธุ์ *E. coli* มีความสามารถใช้อะเซเตทถ้าสายพันธุ์นั้นสร้างกลุ่มเชื้อภายใน 2 วัน ที่ 37°C เมื่อสายพันธุ์นั้นถูกเพาะเลี้ยงบนตัวกลางวุ้นที่มีกรดอะเซติก หรือ อะเซเตทอยู่เป็นแหล่งคาร์บอนตัวเดียว, ตัวอย่างเช่น, ตัวกลางเหลวน้อยที่สุดA(อธิบายข้างล่าง)ที่มี 5 กรัม/ลิตร ของแอมโมเนียมอะเซเตทภายใต้สภาวะที่เหมาะสม คำว่า "สภาวะที่เหมาะสม" หมาย

ถึง อุณหภูมิ, pH, การให้อากาศ หรือ อย่างเลือกได้ให้มีสารอาหารจำเป็น หรือ ที่คล้ายกันสำหรับสายพันธุ์ *E. coli* ที่ถูกเพาะเลี้ยง

สำหรับตัวอย่างของวิธีการสำหรับการทำให้ได้ *E. coli* ของการประดิษฐ์นี้, วิธีการของการเหนี่ยวนำตัวกลายพันธุ์ที่ความสามารถใช้อะเซเตท จากสายพันธุ์ *E. coli* ที่มีความสามารถสร้างอาร์จินีนจะได้ถูกอธิบายข้างล่าง

E. coli ที่มีความสามารถสร้างอาร์จินีนไม่ได้ถูกจำกัดเฉพาะ, ที่ถูกใช้ประกอบโดยที่มันสามารถถูกนำเข้าการมีความสามารถใช้อะเซเตท สายพันธุ์ *E.coli* ดังกล่าวรวมถึงสายพันธุ์ที่สร้างอาร์จินีนที่ขยายพันธุ์จาก *E. coli* K-12, B, C หรือ พวกอนุพันธ์ของมัน

สำหรับตัวอย่างของ *E. coli* ตัวสร้างอาร์จินีน, ต่อไปนี้อาจจะถูกกล่าวถึง: ตัวกลายพันธุ์ที่มีความทนทาน α-เมทธิลเมทไทโอนีน, *p*-ฟลูออโรเฟนิลอะลานีน, D-อาร์จินีน, อาร์จินีน ไฮดรอกซาเมท, s-(2-อะมิโนเอทธิล)-ซิสเตอีน, α-เมทธิลเซอรีน, β-2-ไทเอนิลอะลานีน หรือ ซัลฟากัวนิดีน (การโฆษณาก่อนการตรวจสิทธิบัตรญี่ปุ่นที่ 56-106598), สายพันธุ์ที่สร้างอาร์จินีนที่ซึ่งยีน *arg*A ที่ถอดรหัส N-อะเซติลกลูตาเมท ซินเทเตสถูกนำเข้าไป(การโฆษณาก่อนการตรวจสิทธิบัตรญี่ปุ่นที่ 57-5693) และ ที่คล้ายกัน *E. coli* สายพันธุ์ 237 ที่อธิบายในตัวอย่างที่กล่าวถึงภายหลังเป็นสายพันธุ์ที่สร้างอาร์จินีนที่ใช้โดยมากเช่นเดียวกัน สายพันธุ์ 237 ได้ถูกฝากเก็บไว้ในการเก็บรวมจุลินทรีย์อุตสาหกรรมแห่งชาติรัสเซีย(VKPM)ภายใต้หมายเลขการฝาก VKPM B-7925 ตั้งแต่ 10 เมษายน, 2000, และถูกส่งไปที่ฝากเก็บเดิมที่การฝากเก็บระหว่างชาติบนพื้นฐานข้อตกลงบูดาเปส, เมื่อ 18 พฤษภาคม 2001

สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีความสามารถใช้อะเซเตทอาจจะถูกทำให้ได้มาจากสายพันธุ์ที่สร้างอาร์จินีนที่อธิบายข้างบนโดย, ตัวอย่างเช่น, การทำให้สายพันธุ์ที่สร้างอาร์จินีนกลายพันธุ์ และ การคัดเลือกสายพันธุ์ที่ซึ่งสามารถเติบโตในตัวกลางน้อยที่สุดที่มีกรดอะเซติก หรือ อะเซเตทอยู่เป็นแหล่งคาร์บอนตัวเดียว การทำให้กลายพันธุ์สามารถถูกทำได้โดย, ตัวอย่างเช่น, การฉายรังสีUV หรือ ด้วยสารที่ถูกใช้ตามปกติสำหรับการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น 1-เมทธิล-3-ไนโตร-1-ไนโตรโซกัวนิดีน(NTG) และ กรดไนตรัส การทำให้เกิดการกลายพันธุ์ และ การคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีความสามารถใช้อะเซเตทอาจจะถูกทำซ้ำสองครั้ง หรือ มากกว่า

อาร์จินีนสามารถถูกผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยการเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ *E. coli* ดังที่อธิบายข้างบน, ที่ซึ่งมีการทำหน้าที่ใช้อะเซเตท และ สร้างอาร์จินีน, ในตัวกลางเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตและ สะสมอาร์จินีนในตัวกลาง, และ การเก็บรวมอาร์จินีนจากตัวกลางนั้น

การเติมอะเซติลของกลูตาเมทเป็น N-อะเซติลกลูตาเมท และ การเอาอะเซติลออกของ N-อะเซติลออร์นิทีนเป็นออร์นิทีนในการสังเคราะห์ชีวภาพอาร์จินีนถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ตัวเดียวกัน, ออร์นิทีน อะเซติลทรานสเฟอเรส อีกด้านหนึ่ง, การเติมอะเซติล และ การเอาอะเซติลออกในการสังเคราะห์ชีวภาพอาร์จินีนของ *E. coli* ถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ต่างกัน, N-อะเซติลกลูตาเมท ซินเทส และ N-อะเซติลออร์นิทิเนส, ตามลำดับ ดังนั้น, ถ้าผลพลอยได้เป็นกรดอะเซติกจะถูกนำไปใช้, ผลของมันต่อการผลิตอาร์จินีนยังไม่เป็นที่รู้จักกัน

ในวิธีการของการผลิตอาร์จินีนของการประดิษฐ์นี้, การเพาะเลี้ยง *E. coli*, การเก็บรวม และ การทำให้บริสุทธิ์ของอาร์จินีนจากตัวกลางของเหลวอาจจะถูกทำได้ในแบบคล้ายกับวิธีการหมักที่เคยใช้อยู่เดิมโดยที่อาร์จินีนถูกสร้างขึ้นโดยใช้ *E. coli*

สำหรับแหล่งคาร์บอน, มันเป็นไปได้ที่จะใช้น้ำตาล เช่น กลูโคส, แลคโตส, กาแลคโตส, ฟรุ๊คโตส, หรือ สารย่อยแป้ง, อัลกอฮอล์ เช่น ไกลเซอรอล, หรือ ซอร์บิตอล, หรือ กรดอินทรีย์ เช่น กรดอะเซติก, กรดฟูมาริก, กรดซิตริก หรือ กรดซัคซินิก

สำหรับแหล่งไนโตรเจน, มันเป็นไปได้ที่จะใช้เกลือแอมโมเนียมอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียม ซัลเฟท, แอมโมเนียม คลอไรด์ หรือ แอมโมเนียม ฟอสเฟท, ไนโตรเจนอินทรีย์ เช่น สารย่อยสลายถั่วเหลือง, ก๊าซแอมโมเนีย หรือ แอมโมเนียเหลว

มันจำเป็นที่จะยอมให้มีสารที่ต้องการ เช่น วิตามินบี 1 และ L-ไอโซลูซีน หรือ สารสกัดยีสต์ที่จะให้มีอยู่ในปริมาณที่เหมาะสม เป็นสารอาหารอินทรีย์เล็กน้อย นอกเหนือจากข้างบนนี้, โปแตสเซียม ฟอสเฟท, แมกนีเซียม ซัลเฟท, ไอออนเหล็ก, ไอออนแมงกานีส และ ที่คล้ายกันถูกเติมไปในปริมาณเล็กน้อยได้ถ้าจำเป็น

การเพาะเลี้ยงโดยมากใช้ภายใต้สภาวะมีอากาศเป็นเวลา 16-72 ชม. อุณหภูมิการเพาะเลี้ยงถูกควบคุมไว้ที่ 25°C ถึง 45°C, และ pH ถูกควบคุมไว้ที่ 5-8 ระหว่างการเพาะเลี้ยงสารอนินทรีย์ หรือ อินทรีย์, กรด หรือ ด่าง รวมทั้งก๊าซแอมโมเนีย หรือ ที่คล้ายกันสามารถถูกใช้สำหรับการปรับ pH

การเก็บรวมอาร์จินีนจากน้ำหมักมักจะถูกทำโดยใช้วิธีการเรซินแลกเปลี่ยนไอออน ร่วมกับวิธีการอื่นที่รู้จักแล้ว

หลังจากนี้, การประดิษฐ์นี้จะได้ถูกอธิบายอย่างเฉพาะเจาะจงด้วยการอ้างอิงที่ตัวอย่างต่อไปนี้

<u>ตัวอย่างที่ 1 การเหนี่ยวนำตัวกลายพันธุ์ที่ใช้อะเซเตท</u>

จาก *E. coli* กลายพันธุ์สายพันธุ์ 237 ที่สร้างอาร์จินีน, ตัวกลายพันธุ์ที่เติบโตดีบนตัวกลางวุ้น M9 ที่มีแอมโมเนียม อะเซเตท(5 มก./มล.)เป็นแหล่งคาร์บอน และ ไนโตรเจนเดียวถูกเหนี่ยวนำขึ้น สายพันธุ์ 237 เป็นตัวกลายพันธุ์ที่ทนทานต่อตัวเหมือนไพริมิดีน, 6-อะซายูราซิล, ที่ซึ่งถูกเหนี่ยวนำจาก *E. coli* K12 ilvA::Tn5 โดยการใช้ N-เมทธิล-N'-ไนโตร-N-ไนโตรโซกัวนิดีน (NTG) สายพันธุ์ 237เติบโตได้ไม่ดีบนตัวกลางวุ้น M9 ที่มีแอมโมเนียม อะเซเตท(5 มก./มล.)เป็นแหล่งคาร์บอน และ ไนโตรเจนเดียว สายพันธุ์ 237 ได้ถูกฝากเก็บไว้ในการเก็บรวมจุลินทรีย์อุตสาหกรรมแห่งชาติรัสเซีย (VKPM) ภายใต้หมายเลขการฝาก VKPM B-7925 ตั้งแต่ 10 เมษายน, 2000, และถูกส่งไปที่ฝากเก็บเดิมที่การฝากเก็บระหว่างชาติบนพื้นฐานข้อตกลงบูดาเปส, เมื่อ 18 พฤษภาคม 2001

เซลล์ของสายพันธุ์ 237 ถูกเลี้ยงไว้ข้ามคืนในน้ำเลี้ยง L- ด้วยการเขย่า(หลอดทดลอง, 37 °C) และ ถูกเก็บโดยการปั่นแยก จากนั้น, เซลล์ถูกแขวนลอยซ้ำในสารละลายน้ำเกลือ(0.8%)ที่มี 0.1 กรัม/มล. ของ NTG ภายหลังการถูกกับ NTG ที่ 37°C เซลล์ถูกปั่น, ถูกล้างสองครั้งด้วยน้ำเกลือ และ ถูกใส่ถาดบนตัวกลางวุ้นน้อยที่สุด A, ที่มี 5 กรัม แอมโมเนียม อะเซเตท, 6 กรัม Na_2HPO_4, 3 กรัม KH_2PO_4, 0.5 กรัม NaCl, 0.1 มก. ไทอะมีน, 0.1 กรัม L-ไอโซลูซีน, 15 กรัม วุ้น, ต่อ 1 ลิตรของน้ำ(pH 7.0)

ถาดนี้ถูกเก็บอบไว้เป็นเวลา 5 วัน ที่ 37 °C กลุ่มเชื้อที่เกิดขึ้นภายใน 2 วันบนถาดถูกเก็บมา และ ทำให้บริสุทธิ์โดยการเขี่ยบนถาดวุ้นเหมือนกัน สายพันธุ์แม่ 237 สร้างเป็นกลุ่มเชื้อเฉพาะหลังวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเท่านั้น ความถี่ของตัวกลายพันธุ์ที่ใช้อะเซเตทคือ 6×10^{-5} สายพันธุ์ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ เจ็ดสิบตัวถูกทดสอบสำหรับผลการผลิตอาร์จินีนของมัน ประมาณ ¼ ของตัวแปลงพันธุ์ที่ได้มามีผลการผลิตมากกว่าสายพันธุ์แม่ 237 ตัวสร้างอาร์จินีนดีที่สุดระหว่างพวกมันคือ สายพันธุ์ 382 สายพันธุ์ 382 ได้ถูกฝากเก็บไว้ในการเก็บรวมจุลินทรีย์อุตสาหกรรมแห่งชาติรัสเซีย(VKPM)ภายใต้หมายเลขการฝาก VKPM B-7926 ตั้งแต่ 10 เมษายน, 2000, และถูกส่งไปที่ฝากเก็บเดิมที่การฝากเก็บระหว่างชาติบนพื้นฐานข้อตกลงบูดาเปส, เมื่อ 18 พฤษภาคม 2001

<u>ตัวอย่างที่ 2 การเติบโตของตัวกลายพันธุ์ใหม่บนอะเซเตท</u>

ส่วน 2 มล.ของตัวกลางเหลวน้อยที่สุดA(วุ้นไม่ถูกเติมไป), ที่มีตัวหนึ่งของแอมโมเนียม อะเซเตท(5 กรัม/ลิตร) หรือ กลูโคส(5 กรัม/ลิตร) เป็น แหล่งคาร์บอนเดียว, ถูกใส่ในหลอดทดลอง, ถูกเพาะด้วยหนึ่งห่วงของสายพันธุ์ 382 ที่พบใหม่, อีกตัวอย่างหนึ่งของตัวกลายพันธุ์ที่สร้างอาร์จินีน, สายพันธุ์ 383 และ สายพันธุ์แม่ 237 ของมัน, และถูกถูกเก็บอบไว้เป็นเวลา 16 ชม. ที่ 32 °C ด้วย

การเขย่า การเติบโตถูกตรวจหาโดยการวัดความหนาแน่นการมองเห็นของการเพาะเลี้ยงที่ 540nm ความหนาแน่นการมองเห็นของตัวกลางที่ตอนเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงเป็นประมาณ 0.05 ผลที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1

สายพันธุ์	การเติบโตในตัวกลางเหลวน้อยที่สุดเป็นเวลา 16 ชม. ด้วย:	
	กลูโคส (0.5%)	แอมโมเนีย อะเซเตท (0.5%)
237 (แม่)	1.8	0.4
382	1.5	1.0
383	1.6	0.7

<u>ตัวอย่างที่ 3 การสร้างอาร์จินีนโดยตัวกลายพันธุ์ที่สร้าง L-อาร์จินีนที่พบใหม่ในการหมักในหลอดทดลอง</u>

สายพันธุ์ 382, 383 ที่พบใหม่ และ สายพันธุ์แม่ 237 ของมัน ถูกเพาะเลี้ยงในตัวกลางการหมัก ตัวกลางการหมักมี 60 กรัม กลูโคส, 25 กรัม แอมโมเนียม ซัลเฟท, 3 กรัม KH_2PO_4, 1 กรัม $MgSO_4.7H_2O$, 0.1 มก. ไทอะมีน, 5 กรัม สารสกัดยีสต์(Difco), 25 กรัม แคลเซียม คาร์โบเนท, ต่อ 1 ลิตรของน้ำ(pH 7.2) กลูโคส และ ซอล์คถูกแยกทำให้ปลอดเชื้อ 2 มล. ของตัวกลางถูกใส่ไปในหลอดทดลอง, ถูกเพาะด้วยหนึ่งห่วงของจุลินทรีย์ทดสอบ, และ การเพาะเลี้ยงถูกทำที่ 32°C เป็นเวลา 3 วัน ด้วยการเขย่า ปริมาณที่สะสมอยู่ของอาร์จินีนในตัวกลางเพาะเลี้ยงได้แสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2

สายพันธุ์	อาร์จินีน (กรัม/ลิตร)
237 (แม่)	5.1
382 (ตัวกลายพันธุ์ใช้ อะเซเตท)	12.0
383 (ตัวกลายพันธุ์ใช้ อะเซเตท)	7.7

<u>ตัวอย่างที่ 4 การสร้างอาร์จินีนโดยตัวกลายพันธุ์ที่สร้าง L-อาร์จินีนที่พบใหม่ในการหมักในเหยือก</u>

สายพันธุ์ 382 ที่พบใหม่ และ สายพันธุ์แม่ 237 ของมัน ถูกเพาะเลี้ยงที่ 32°C เป็นเวลา 8 ชม. ด้วยการเขย่า จากนั้น, การเพาะเลี้ยงเชื้อที่ได้มาถูกเพาะเข้าไปในเหยือกการหมักที่มี 0.5 ลิตรของตัวกลางการหมัก, ตามด้วยการคนที่ 700 rpm ที่ 32°C และ อัตราการให้อากาศ 0.5 ลิตร/นาที ตัวกลางการหมักมี 100 กรัม กลูโคส, 9 กรัม แอมโมเนียม ซัลเฟท, 1 กรัม KH_2PO_4,

0.4 กรัม $MgSO_4.7H_2O$, 0.02 กรัม $FeSO_4.7H_2O$, 0.02 กรัม $MnSO_4.7H_2O$, 0.2 กรัม ไนโตรเจนทั้งหมดของสารย่อยสลายถั่วเหลือง, 0.3 กรัม L-ไอโซลูซีน, 0.4 มก. ไทอะมีน ใน 1 ลิตรของน้ำ(pH 7.0) ระหว่างการเพาะเลี้ยง, สารละลายแอมโมเนีย(4.7 M)ถูกเติมไปเพื่อปรับ pH ที่ 7.0 และ เพื่อให้แหล่งไนโตรเจน การเพาะเลี้ยงถูกทำเป็นเวลา 42 ชม. ปริมาณที่สะสมอยู่ของอาร์จินีนในตัวกลางเพาะเลี้ยง และ ผลที่ได้รับจากกลูโคสได้แสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3

สายพันธุ์	อาร์จินีน (กรัม/ลิตร)	ผลที่ได้รับจากกลูโคส (%)
237 (แม่)	4.5	5.2
382 (ตัวกลายพันธุ์ใช้ อะเซเตท)	19.3	23.9

ตัวกลายพันธุ์ที่ใช้อะเซเตทแสดงผลการผลิตของอาร์จินีนสูงกว่าสายพันธุ์แม่

<u>วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด</u>

วิธีการที่กล่าวข้างต้นเป็นวิธีการที่ดีที่สุดในการประดิษฐ์

ข้อถือสิทธิ

1. *Escherichia coli* ซึ่งมีความสามารถผลิตอาร์จินีน และ ความสามารถในการใช้อะซีเตต หรือ กรดอะซีติก ในฐานะเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยวได้

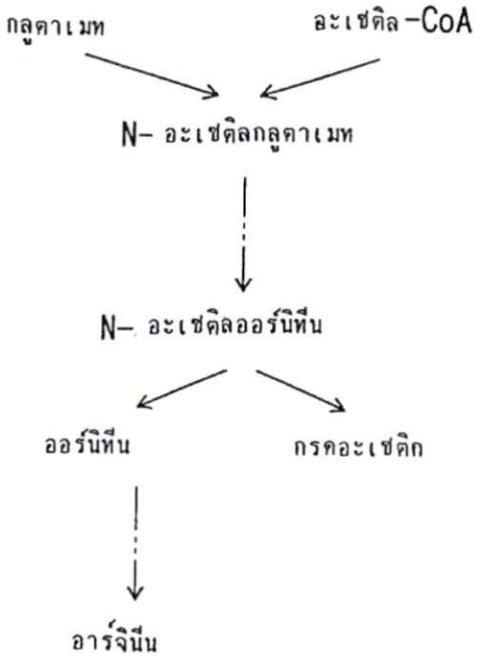
2. *Escherichia coli* ตามข้อถือสิทธิที่ 1 โดยที่แบคทีเรียนั้นสร้างโคโลนีภายใน 2 วัน ที่ 37°ซ เมื่อแบคทีเรียนั้นถูกเพาะเลี้ยงบนตัวอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นวุ้นที่ประกอบด้วยกรดอะซีติก หรือ อะซีเตต ในฐานะเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยว

3. *Escherichia coli* ตามข้อถือสิทธิที่ 1 หรือ 2 โดยที่แบคทีเรียนั้นเป็นอนุพันธ์ของ *Escherichia coli* K12

4. *Escherichia coli* ที่มีหมายเลขนำเข้า VKPM B-7926

5. วิธีการผลิตอาร์จินีนที่ประกอบด้วยขั้นตอนของการเพาะเลี้ยง *Escherichia coli* ตามข้อใดข้อหนึ่งของข้อถือสิทธิที่ 1 ถึง 4 ในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อผลิต และ สะสมอาร์จินีนในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น

รูปที่ 1


กลูตาเมท
อะเซติล-CoA
N- อะเซติลกลูตาเมท
N- อะเซติลออร์นิทีน
ออร์นิทีน
กรดอะเซติก
อาร์จินีน

บทสรุปการประดิษฐ์

อาร์จินีน สามารถถูกผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยการเพาะเลี้ยง *Escherichia coli* ที่ ซึ่งสามารถสร้างอาร์จินีน และมีความสามารถใช้อะเซเตทในตัวกลางเพาะเลี้ยงเพื่อผลิต และสะสมอาร์จินีนในตัวกลาง และการเก็บรวมอาร์จินีนจากตัวกลางนั้น