

# Využití kontinuální kultivace při biosyntéze aminokyselin

Ing. PETR PILÁT, CSc., Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

Do redakce došlo 4. srpna 1976

663.15:547.466  
547.466.64

## I. Kyselina L-glutamová

Kontinuální kultivace mikroorganismů jako metodologický přístup k získávání mikrobiální buněčné hmoty nebo produktů metabolismu má řadu značných výhod ve srovnání s ostatními metodami. Tímto typem kultivace je možno dosáhnout značně příznivějších parametrů procesu (např. produktivita systému), které mají přímý ekonomický efekt. Základní otázky teorie kontinuálních kultivací byly rozpracovány již před řadou let. Podle tradičních přístupů sloužily a často doposud slouží k návrhu parametrů kontinuálního procesu data získaná studiem kinetiky jednorázové kultivace. Tento jednostranný přístup k řešení této problematiky představuje ovšem často značné zjednodušení a v řadě procesů (tvorba produktů) se setkal s nezdarem. V kontinuálním procesu se kultura vyvíjí za odlišných poměrů než v periodickém procesu. Během dynamicky ustáleného stavu roste populace mikroorganismů za prakticky konstantních podmínek, kdežto v podmínkách jednorázové kultivace se většina kultivačních parametrů mění. Ve víceúrovňové kontinuální kultivaci dále rychle narůstá nehomogenita populace, přechod z jednoho stupně do druhého představuje změnu parametrů kultivace skokem, což má zvláště velký význam u procesů, kde se produkt tvoří až po růstové fázi (platí zejména pro aktinomycety, též plísňe). Samostatným problémem je složení kultivačního média. Téměř ve všech případech se doposud logicky vychází z optimálního složení živné půdy pro jednorázovou kultivaci. Vzhledem k uvedeným kvalitativním rozdílům obou typů pěstování mikroorganismů nemusí tato kultivační půda vyhovovat potřebám kultury rostoucí za kontinuálních podmínek. Vhodné médium je možno výhodně zjistit přímo v kontinuální kultivaci s využitím matematických metod optimálního plánování experimentů. Aplikace kontinuální výroby v mikrobiologické praxi je podle povahy používaného procesu ve větší či menší míře ovlivňována dalšími významnými problémy, mezi nimiž patří k nejdůležitějším stabilita produkční kultury a potlačení kontaminace nežádoucími mikroorganismy. Z uvedených důvodů je v současné době kontinuální kultivace v průmyslovém měřítku využívána k syntéze biologicky aktivních látek pouze v omezeném rozsahu. Jde o fermentační výrobu kyseliny octové, etanolu, butanolu, acetonu, krmného droždí, vitamínu B<sub>12</sub> a zpracování vína a piva ve větším či menším měřítku. Této metody se také používá při čištění odpadních vod, pěstování vodních řas apod. [Mežinja *et al.* 1974]. Výroba pekařského droždí, antibiotik, aminokyselin, enzymů, piva, etanolu a butanolu tímto způsobem je doprovázena řadou již uvedených problémů. Při studiu možností kontinuální biosyntézy aminokyselin byl až do nedávné doby výzkum omezen pouze na kyselinu L-glutamovou. Teprve v po-

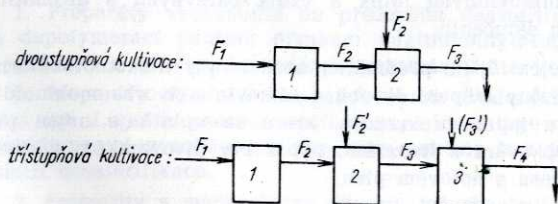
sledních letech je předmětem zájmu využití zmíněné metody kultivace také pro biosyntézu L-lyzinu.

Prvními literárními zmínkami o studiu podmínek pro kontinuální biosyntézu kyseliny L-glutamové je řada prací japonských autorů z let 1962–1963. Hashida *et al.* [1962] s použitím kmenů *Brevibacterium* sp. rozdělili proces do dvou fází, růstové a produkční. Po optimalizaci růstové fáze (koncentrace glukózy, močoviny, míchání kultury) dosáhli snížení generační doby až na 1,5 h (statická kultura měla generační dobu 11,5 h). Studium vlivu velikosti inokula na produkční fázi procesu bylo při nalezené optimální hladině (7,4 g/l) dosaženo akumulace 22,5 g/l kyseliny glutamové. V závěru práce jsou diskutovány možnosti dvoustupňového kontinuálního produkčního procesu. Stejný autorský kolektiv [Matsuo *et al.* 1963] se v další práci zabýval vlivem antibiotik na produkční proces. Autoři zjistili inhibiční vliv na růst u 11 antibiotik. U penicilinu G, streptomycinu a dextromycinu byly nalezeny koncentrace, při kterých byl růst inhibován, ale produkce aminokyseliny pokračovala. V další sérii pokusů byla upřesněna nejvhodnější fáze procesu k dávkování těchto látek (penicilin). Při analýze kinetiky fermentace s cílem navrhnout víceúrovňový kontinuální systém rozdělili Mimura *et al.* [1963] proces do 5 fází (logaritmický růst, lineární růst, lag-fáze produkce, produkční fáze a fáze poklesu produkce). Byl nalezen značný vliv velikosti Reynoldsova čísla míchání na hodnotu rychlosti růstu (při Re větším než 1,5 · 10<sup>7</sup> specifická růstová rychlost rychle klesala). Autoři prokázali použitelnost odvozené teoretické rovnice vztahu mezi růstem kultury a spotřebou cukru pro kontrolu koncentrace tohoto substrátu v přítoku do 1. stupně víceúrovňového systému bez zřetele na velikost inokula. Podobnými problémy se dále zabývali Ueda *et al.* [1963 a, b, c, d, 1969]. V první ze zmíněných řad prací se zaměřili autoři na problémy kontaminace. Izolovali přes 200 kmenů kontaminujících mikroorganismů a v médiu obsahujícím glukózu zkoušeli u řady látek schopnost inhibovat jejich růst. Jako efektivní byly nalezeny fenoly, nitrofurany, sulfonamidy, povrchově aktivní látky, antibiotika, barviva, formaldehyd a vitamín K<sub>3</sub>. K těmto sloučeninám byly však citlivé také produkční mikroorganismy [*Brevibacterium devaricatum* a *Brev.* sp. 107], ale několikanásobným pasážováním na šikmém agaru, obsahujícím příslušný inhibitor, bylo dosaženo růstové rezistence k těmto látkám. Produkce kyseliny glutamové byla však značně snížena. Tento negativní vliv byl odstraněn použitím směsi inhibitorů a další adaptace produkčních kmenů opakovanou kultivací v médiu, obsahujícím směs těchto látek. V další práci studovali autoři vliv směsi formaldehydu, streptomycinu, nitrofurazonu a osvanu na růstovou rychlost a délku lag-fáze růstu kontaminuj-



cích i produkčních kmenů v jednorázové i kontinuální kultivaci. Došli k názoru, že tímto způsobem je možno v kontinuální kultivaci regulovat hladinu kontaminace. Při studiu kontinuální biosyntézy kyseliny L-glutamové byl použit třístupňový systém. První fermentor sloužil pouze k propagaci aktivních buněk. Druhý stupeň byl využíván ke kompletaci růstu kultury a fermentaci větší části cukrů. Doba zdržení mikroorganismů ve třetím fermentoru umožňovala dokončení celé fermentace. Pokusy byly konány s využitím údajů předešlých prací (kontrola kontaminace). Autoři došli k závěrům: nejdůležitějším problémem pro kontinuální kultivaci je kontrola přechodných jevů, které nastávají zvláště v 1. fermentoru po startu kontinuálního přítoku, hlavní příčinou snížení produktivity systému je značný rozdíl hladin fermentační fáze mezi prvním a druhým stupněm, k získání vysokého produkčního výtěžku je nutno upravit přísadek biotinu během kontinuálního živění. V sérii experimentů bylo zjištěno, že růstově-limitním faktorem je také obsah iontů manganu. Při výchozí koncentraci glukózy 103 g/l dosahovala akumulace kyseliny glutamové až 38 g/l a zjištěný výtěžek produktu byl totožný jako u jednorázové kultivace (39 %). Z prací, které jsou většinou v japonském originálu, nebylo možno získat některé podklady pro závěry, ke kterým autoři došli. Je však možno se domnívat, že výsledky dosažené a prezentované při kontrole procesu kontaminace i při vlastním produkčním procesu nejsou zcela jednoznačné, protože např. více-  
stupňová kontinuální kultivace nebyla sledována dostatečně dlouhou dobu (včetně doby ustalování rovnovážného stavu 24–50 h). Týká se to především stability celého systému.

Velmi podrobně rozpracovali kontinuální biosyntézu kyseliny glutamové pracovníci firmy Merck (patent USA č. 3 402 104, 1968, patent VB č. 1 126 573, 1968) s produkčním kmenem *Micrococcus glutamicus* ATTC 13 761, vyžadujícím biotin. Předmětem patentů je dvoustupňová nebo třístupňová kontinuální kultivace producenta s použitím sacharidického zdroje uhlíku (glukóza, melasa). U obou variant kontinuální kultivace je první fermentor používán jako růstový a slouží k dosažení výchozí produkční koncentrace mikrobiálních buněk. Druhý stupeň dvoustupňové kontinuální kultivace (produkční) a druhý a třetí stupeň třístupňové kultivace (přechodný a produkční) slouží již k hromadění produktu. Zvláštností postupu podle těchto patentů je umělé vytvoření růstově inhibičního prostředí. Autoři se zmiňují o dvou způsobech dosažení tohoto efektu. Prvním z nich je limitace růstu kultury řízeným vyčerpáním obsahu některého růstového faktoru v kultivačním médiu (biotin). Druhým způsobem je inhibice růstu antibiotiky (penicilin, cefalosporin, oxamycin, streptomycin, bacitracin a další). Stejněho účinku může být dosaženo chemickými inhibitory, jako jsou fenol, propionan sodný, resorcinol, cetyltrimetylamoniumbromid atd. Autoři dali ve většině případů přednost druhému způsobu (penicilin). Celkové uspořádání obou variant kontinuální kultivace je znázorněno na schématech:



Jednalo se tedy o dvoustupňovou, resp. třístupňovou kontinuální kultivaci v sériovém uspořádání fermentorů s dalším přítokem do 2. stupně, popřípadě do 2. i 3. stupně. Do 2. stupně dvoustupňové kultivace bylo kon-

tinuálně přidáváno buď kompletní živné médium s přísadkem penicilinu nebo pouze zdroj uhlíku (melasa, glukóza) a penicilin. U třístupňového procesu přitékala do 2. fermentoru směs substrátu a penicilinu. Třetí fermentační stupeň, produkční, sloužil k dokvašování a byl buď volně průtočný bez dalšího přítoku, nebo byl kontinuálně přidáván pouze zdroj uhlíku (melasa) již bez penicilinu. K dosažení odpěňovacího efektu obsahovaly všechny přítoky do systému polymér propylénglykolu (Polyglycol 2000) v koncentracích 0,2–0,4 g/l. Žádané koncentrace buněk produkčního kmene bylo dosaženo v prvním stupni systému. Koncentrace mikroorganismů byla kontrolována hladinou substrátu a značný vliv na kvalitu a kvantitu buněk kultury v celém systému měly též další kultivační parametry (dodávka kyslíku, pH, teplota a koncentrace CO<sub>2</sub>, kontrolovaná na výstupu z fermentoru). Přídavek inhibitoru do druhého stupně vedl ke skokové změně v metabolismu kultury. Růst byl prakticky zastaven a kyselina glutamová exkretována do média. Dostatečně dlouhá doba zdržení ve 2. stupni dovozovala akumulaci relativně vysokých koncentrací produktu a umožňovala použít dvoustupňový systém. Přesto u procesu, který vyžaduje dlouhou dobu zdržení ve 2. stupni představuje třístupňová kontinuální kultivace další pokrok. S využitím 3. stupně (produkčního) bylo možno zkrátit celkovou fermentační dobu a produkt získávat s vyšším výtěžkem a ve vyšší koncentraci. Produkce a výtěžek kyseliny glutamové v produkčním stupni dvoustupňové kultivace a přechodném a produkčním stupni třístupňové kultivace byly ovlivněny kultivační teplotou, pH média, dodávkou kyslíku, koncentrací sacharidů, aktuální koncentrací kyseliny glutamové, koncentrací inhibitoru, dobou zdržení, poměrem přítoku z růstového stupně k celkovému přítoku, dobou přestupu kultury mezi jednotlivými fermentory. U poměrů  $R_t$  nebo  $R_p$  (podle schématu např. pro dvou-

stupňovou kultivaci  $R_p = \frac{F_2}{F_2 + F_2'}$ ) používali autoři

rozmezí 0,4:1 až 0,75:1. V dvoustupňové kontinuální kultivaci s celkovou dobou zdržení 38,9 h bylo dosaženo akumulace kyseliny glutamové 52 g/l s celkovou výtěžností 43,4 %. Třístupňovou kontinuální kultivací (celková doba zdržení 17,7 h) bez přísady melasy do 3. stupně dosáhli koncentrace 34,7 g/l kyseliny na výstupu ze systému a celkové výtěžnosti 42,2 %. Podobné výsledky byly naměřeny pro obě varianty i v poloprodučním měřítku. Při limitaci růstu deficiencí biotinu byla účinnost procesu poněkud nižší. O dalších pracích zabývajících se kontinuální biosyntézou kyseliny L-glutamové se zmiňují ve své knize Mežinja *et al.* (1974). Jsou to práce Uedy (1969), Bekera a Viestura (1970) a Yamady (1972). Těmito autory byl navržen třístupňový systém kontinuální kultivace mikroorganismů produkujících kyselinu glutamovou. Pokusy byly prováděny na půdách, obsahujících melasu, glukózu nebo n-alkány. Základními zkoumanými problémy byl výběr optimální koncentrace biotinu a inhibitorů, potlačení nežádoucí kontaminace. Jako efektivní inhibitory pro potlačení kontaminace byly potvrzeny látky: sloučeniny fenolu, nitrofuranu, sulfanilamidy, formaldehyd, antibiotika a vitamín K<sub>3</sub>. Koncentrace těchto látek, potřebná k potlačení kontaminace o 40 % je však tak vysoká, že ovlivňuje negativně i produkční kmény. Tato skutečnost donutila především japonské autory hledat kmény rezistentní ke směsi antibakteriálních látek. Takové kmény jsou pro průmyslové využití nejperspektivnější (Yamada, 1972) a v posledních letech byly již také izolovány.

V SSSR probíhá také výzkum kontinuální biosyntézy kyseliny  $\alpha$ -ketoglutarové, která je prekurzorem kyseliny glutamové. Práce Sidka a Likovského (1967) a Bekera a Mežinji (1973) představují pokus o získání této kyseliny na bázi n-alkánů použitím kultury *Candida lipolytica*.



Stabilní kontinuální proces se uskutečňuje při zředovací rychlosti 0,03–0,05 h<sup>-1</sup>. Produktivita kultury v dvoustupňovém systému je 1,2–1,5krát vyšší než v jedноступňovém. Při použití vícestupňového kontinuálního procesu je možno očekávat další zvýšení.

Z dostupných údajů vyplývá, že primární problémy, doprovázející řešení vícestupňové kontinuální biosyntézy kyseliny glutamové — stabilita produkčního kmene a potlačení růstu nežádoucí mikroflóry — nebyly doposud uspokojivě vyřešeny, a proto tento progresivní typ kultivace nedosáhl zatím využití v průmyslovém měřítku.

## Literatura

- [1] BEKER, M. E., MEŽINJA, G. R.: Teorija i praktika neprerivnogo kultiviranja mikroorganizmov, AN SSSR, Moskva, 1973, s. 12.
- [2] BEKER, M. E., VIESTURE, L. A.: Mikrobiologičeskaja promyšlennost', 1970, č. 3, s. 55.
- [3] HASHIDA, W. et al.: Amino acids **6**, 1962, s. 58.
- [4] MATSUO, T., KUBO M., HASHIDA, W.: Amino acids **7**, 1963, s. 51.
- [5] MEŽINJA, G. R. et al.: Teorija i praktika neprerivnogo kultiviranja mikroorganizmov, Nauka, Moskva, 1974.
- [6] MIMURA, A. et al.: J. Ferment. Technol. **41**, 1963, s. 275.
- [7] SIĐKO, F. F., LIKOVSKIJ, G. M.: Neprerivnoe upravljajemoe kultivovanie mikroorganizmov, Nauka, Moskva, 1967.
- [8] UEDA, K. et al.: J. Ferment. Technol. **41**, 1963a, s. 148.
- [9] UEDA, K. et al.: J. Ferment. Technol. **41**, 1963b, s. 450.
- [10] UEDA, K., TAKAHASHI, H., OGUMA, T.: J. Ferment. Technol. **41**, 1963c, s. 645.
- [11] UEDA, K., TAKAHASHI, H., OGUMA, T.: IAM Symp. Microbiol. No. 5, Biochem. Eng., Tokyo, Proc., 1963d, s. 232.
- [12] UEDA, K.: Ferment Advan., 3rd Internat. Ferment. Symp., New Brunswick, Proc., Perlman, D., E., Academic Press, London, New York, 1969, s. 43.
- [13] YAMADA, K.: The microbial production of amino acids, Ko-1975, s. 24.

**Pilát, P.: Využití kontinuální kultivace při biosyntéze aminokyselin. I. Kyselina L-glutamová.** Kvas. prům. **23**, 1977, č. 3, s. 60–62.

Článek podává přehled o současném stavu využití metody kontinuální kultivace pro biosyntézu kyseliny glutamové. Hlavní problémy řešení vícestupňové fermentace, stabilita produkčního kmene a potlačení růstu kon-

taminujících mikroorganismů, nebyly doposud uspokojivě vyřešeny a proto tento výhodný typ kultivace mikroorganismů nedosáhl zatím využití v průmyslovém měřítku.

**Пилат, П.: Применение непрерывной культивации для биосинтеза аминокислот. I. L-глутаминовая кислота.** Квас. прум. **23**, 1977, № 3, стр. 60–62.

В статье приведен обзор современной уровни применения метода непрерывной культивации для биосинтеза L-глутаминовой кислоты. Самые важные проблемы решения многоступенчатой ферментации, устойчивость производственного штамма и ингибирование роста контаминации, не были до сих пор удовлетворительно разрешены и потому этот выгодный тип культивации не достигнул ещё применения в промышленном масштабе.

**Pilát, P.: The Use of Continuous Cultivation for Biosynthesis of Amino Acids. I. L-glutamic acid.** Kvas. prům. **23**, 1977, No. 3, pp. 60–62.

The article gives the survey about the recent state of using the continuous cultivation for biosynthesis of L-glutamic acid. The main problems of solving the multi-stage cultivation, including the stability of the strains and the inhibition of contaminants has not been satisfactorily solved. Hence this advantageous type of fermentation has not reached the wide industrial appreciation.

**Pilát, P.: Verwendung der kontinuierlichen Kultivierung für die Biosynthese der Aminosäuren. I. Die L-Glutaminsäure.** Kvas. prům. **23**, 1977, No. 3, S. 60–62.

Der Artikel gibt eine Übersicht über den gegenwärtigen Stand der Ausnutzung der kontinuierlichen Kultivierung für die Biosynthese der L-Glutaminsäure. Die Hauptprobleme der Lösung der mehrstufigen Fermentation, die Stabilität des Produktionsstammes und die Hemmung der Kontamination, wurden noch nicht befriedigend gelöst und darum ist diese vorteilhafte Art der Kultivierung der Mikroorganismen in industriellem Massstab bisher nicht verbreitet.