

# Využití kontinuální kultivace při biosyntéze aminokyselin

## II. L-lysin

663.15:547.466 663.132-932

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

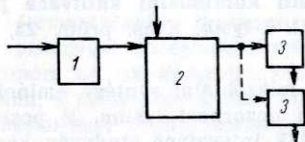
Do redakce došlo 20. srpna 1976

L-lysin je aminokyselinou, které je v posledních letech ve fermentačním průmyslu věnována největší pozornost. Týká se to též výzkumu kontinuálních kultivací, jimiž se v současné době zabývají nejvíce sovětsí pracovníci.

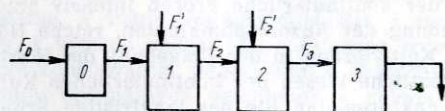
První studií s využitím kontinuálního procesu biosyntézy lysinu byla práce Slezáka et al. (1969). Autoři sledovali stabilitu produkční auxotrofní mutanty *Corynebacterium sp.* v jednodupňové kontinuální kultivaci. Percentuální zastoupení auxotrofního a prototrofního (reverze) kmene bylo po dobu 110 hodin téměř neměnné (4 až 5 % neproduktivního prototrofního kmene). Po uplynutí této doby se zastoupení prototrofa prudce zvyšovalo. S využitím údajů japonského patentu č. 26 943 z roku 1963 o preferenční inhibici růstu prototrofních kmenů erythromycinem bylo dosaženo poněkud lepších výsledků, avšak po 110. hodině kultivace zastoupení neproduktivního kmene opět prudce vzrostlo. Slezák et al. dále studovali proces biosyntézy lysinu v 2stupňové kontinuální kultivaci. K zajištění dostatečné délky kontinuálního procesu byl po 90 hodinách první stupeň nahrazen novou, čerstvě připravenou kulturou. Bylo zjištěno, že vyšší zředovací rychlost v 1. stupni má pozitivní vliv na biosyntézu lysinu a ve 2. stupni se koncentrace produktu zvětšuje se snižováním zředovací rychlosti. Maximální produkce bylo dosaženo při  $D_1 = 0,36 \text{ h}^{-1}$  a  $D_2 = 0,022 \text{ h}^{-1}$  (64 % ve srovnání s jednorázovou kultivací). Přerůstání neproduktivních prototrofních kmenů se snažili řešit také Davydovič et al. (1974) u kmene *Brevibacterium sp. 22L*. Zjistili, že optimální pH kultivace pro obě mutanty jsou velmi blízká (6,9–7,0) a koncentrace lysinu vyšší než 30 g/l má inhibiční vliv na růst obou mikroorganismů. Podle Shiia a Sana (1969) má být růst revertovaných kultur inhibován některými aminokyselinami, avšak po sledování vlivu DL-methioninu, L-cysteinu, DL-serinu a DL-valinu nebyl nalezen žádný významný efekt. Podobného výsledku bylo dosaženo dávkováním antibiotik (erythromycin a levomycin). Růst obou mikroorganismů byl modelován a matematicky vyjádřen kontinuální kultivací při zředovací rychlosti  $D = 0,25 \text{ h}^{-1}$ . Mežinja a Cedere (1972) sledovali u kultury *Brev. sp. 22* vliv kvality a kvantity inokula na proces. Při použití kultury připravené kontinuálním způsobem se cyklus fermentace zkracoval o 25 % a bylo zjištěno, že podmínky přípravy inokula neovlivňují ekonomický koeficient tvorby lysinu. Vyšší výchozí množství buněk kultury (přes 15 % celkového objemu) vedlo k eliminaci lag-fáze růstu a současně se dosáhlo intenzivnější tvorby lysinu. Při optimální 30 % koncentraci inokula se fermentační doba zkracovala o 17 % a také ekonomický koeficient tvorby lysinu vrcholil hodnotou 32,6 % (vztaženo na využití sacharidy). Rozborem dynamického rovnovážného stavu v kontinuální kultivaci

*Brevibacterium sp. 22* se zabývala Mežinja (1975). Růst kultury v půdě s melasou byl sledován v jednodupňovém chemostatu při zředovacích rychlostech  $D = 0,05$  —  $0,25 \text{ h}^{-1}$ . Kontinuální systém zůstával stabilní při  $D = 0,05$  —  $0,20 \text{ h}^{-1}$ . Při změně průtoku pozorovala autorka oscilace parametrů systému a délka této přechodné periody byla závislá na tom, do jaké míry se nový průtok lišil od původního. Vliv míchání a parciálního tlaku kyslíku na růst a produkci lysinu, biochemii a morfologii stejné kultury za podmínek jednodupňové kontinuální kultivace je obsahem práce Bekera et al. (1973). Při  $pO_2 = 0,01 \text{ MPa}$  (0,1 at) a  $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$  pozorovali autoři maximální růst, produkce lysinu se zvyšujícími se otáčkami míchadla klesala. Aktivita citrátdehydrogenázy se 3,5krát snížila a naopak aktivita laktátdehydrogenázy se 2 až 2,5krát zvýšila. Vysoký stupeň turbulence média působil zvýšení celkové redukční aktivity, poolu aminokyselin a buněčných proteinů. Všechny tyto skutečnosti se odrážely v intenzifikaci strukturálního metabolismu buňky a snížení aktivity syntetického procesu. Po snížení parciálního tlaku kyslíku [ $pO_2 = 0,001 \text{ MPa}$  (0,01 at)] bylo pozorováno snížení nárůstu kultury a zvýšení produkce lysinu. Aktivita endogenních procesů v buňce se snížila (7,7krát) stejně jako celková redukční aktivita. Aktivita obou enzymů zůstávaly na konstantní úrovni. Zvýšení specifické růstové rychlosti [ $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ ,  $pO_2 = 0,001 \text{ MPa}$  (0,01 at)] vedlo k intenzifikaci strukturálního metabolismu a energetických procesů v buňce. Tato skutečnost byla indikována zvýšením celkové redukční aktivity (3krát), proteinsyntetické aktivity a akumulací proteinů a volných aminokyselin. Změna aktivity citrátdehydrogenázy nebyla významná a aktivita laktátdehydrogenázy se zvýšila 5krát. Akumulace biomasy byla tedy stimulována při vyšších a naopak optimálních podmínkách pro produkci lysinu byly nalezeny při nižších parciálních tlacích kyslíku. Práce Ermujža et al. (1975) představuje pokus o optimalizaci kultivačních podmínek producenta lysinu *Brev. sp. 22* v jednodupňové kontinuální kultivaci matematickými metodami plánování experimentů, tedy optimalizaci růstové fáze produkčního procesu. K optimalizaci použili autoři metodu plánování pokusů a metodu regresní analýzy podle Nalimova a Černové (1965). Jako kritérium optimalizace s cílem získat maximální množství aktivní kultury byla použita produktivita systému  $P = D \cdot X$  [g/l.h], jako proměnné parametry zvoleny teplota kultivace, intenzita vzdušnění, pH kultivace, koncentrace sacharidů a zředovací rychlost. Bylo konstatováno, že funkce vazby mezi vstupními faktory a kritériem optimalizace je možno pro oblast optima s uspokojivou přesností aproximovat vícečlenem 3. stupně. Plánování experimentů zakončené vymezením oblasti optima umožnilo snížit nutný počet měření 2 až 3krát.

Kontinuální kultivace jako metodologický přístup k biosyntéze lysinu pronikla také do patentové literatury. Z roku 1973 pochází práce Zaraka (patent SSSR č. 255 161). Předmětem patentu je 3stupňová kontinuální kultivace produkčního kmene *Micrococcus glutaminus* s využitím melasy jako zdroje uhlíku. K udržení sterility prostředí se používají nitrofuránové sloučeniny. Celkové uspořádání systému je znázorněno na schématu:



Do prvního (spouštěcího) fermentoru je dávkována půda obsahující melasu (10 %) a tento stupeň slouží k akumulaci biomasy kultury s 30 až 50 % utilizací substrátu. Do dalšího (pracovního) fermentoru přitéká obsah předešlého stupně a současně je přidávána další fermentační půda, obsahující 15 % melasy. V tomto fermentoru je substrát využíván z 90 až 92 %. Další částí aparatury jsou dva dokvašovací tanky používané střídavě k semikontinuálnímu dokončení procesu. Podle autora toto provedení fermentace značně zvyšuje rychlost růstu a tím intenzifikuje proces. V práci není proveden rozbor procesu ani příklady použití. Dalším sovětským patentem [č. 258 845, 1973] je práce autorů Mežinja *et al.*, zabývající se vícestupňovou kontinuální biosyntézou lysinu s použitím kmene *Brev. sp. 22*. Kontinuálně pracující prvý stupeň (inokulátor) při  $D = 0,17 \text{ h}^{-1}$  (maximální produktivita systému) poskytne za 24 hod. 4krát vyšší množství buněk kultury, než je možné na stejné aparatuře získat periodickým postupem. Hlavní proces fermentace probíhá kontinuálně v několika navzájem spojených fermentorech (jejich počet autoři blíže neurčují) za těchto podmínek  $D = 0,03$  až  $0,2 \text{ h}^{-1}$ , pH 6,2–7,0, intenzita aerace 35–40 mg  $\text{O}_2/\text{l.min}$  (sulfitová metoda). V prvním z těchto stupňů se předpokládá další přídavek substrátu. Také v této práci nejsou uvedeny příklady použití a údaje o vlastnostech používaného mikroorganismu, především o stabilitě během kontinuální kultivace. V roce 1974 byla podána v ČSSR přihláška patentu sovětských autorů Viesture *et al.* (PV 125-74, 1976). Práce se týká periodické nebo vícestupňové kontinuální biosyntézy lysinu na bázi sacharických zdrojů uhlíku, kyseliny octové a máselné. Řízeným přídavkem aminokyselin, potřebných pro růst kultury a stimulatorů biosyntézy lysinu regulují autoři procesy tvorby biomasy a produktu tak, aby kultura byla během celé kultivace udržena v aktivním stavu a tím se zvýšily výtěžky lysinu. Zmíněné aminokyseliny (pro kmen *Brevibacterium sp. 22L* threonin a methionin) a stimulatory (thiamin a biotin) mohou být přidávány ve formě čistých látek nebo zdrojů (kukuřičný extrakt, melasa, hydrolyzát kvasnic nebo arašídové mouky). Tímto způsobem má být dosaženo 20% zvýšení výtěžků lysinu (až na 36 % podle váhy využitého cukru). Uspořádání vícestupňové kontinuální kultivace je znázorněno na schématu:



Autoři nazývají tento způsob kontinuální kultivace 3stupňovým systémem, ale jelikož vlastním produkčním fermentorům (1, 2, 3) předchází kontinuální inokulační stupeň (0), jde prakticky o 4stupňovou kontinuální apa-

raturu. Do prvního fermentoru se přivádí čerstvé médium, složení podobné živné půdě, používané při fermentaci periodickým postupem. Do tohoto stupně se dále kontinuálně přivádí inokulum v množství 15 až 25 %, vztaženo na objem média. Kultivační kapalina z prvního fermentoru postupuje kontinuálně dále do druhého a třetího tanku. Přitom se zředovací rychlost  $D$  pohybuje v rozmezí 0,12 až  $0,14 \text{ h}^{-1}$ . První fermentor slouží k dosažení koncentrace buněk produkční kultury, která je optimální pro biosyntézu lysinu. Ve druhém a třetím stupni probíhá v podstatě pouze syntéza aminokyselin. Ke zvýšení koncentrace lysinu ve fermentační kapalině se do druhého fermentoru přivádějí (kromě zdrojů aminokyselin a biostimulatorů) periodicky nebo kontinuálně plně asimilovatelné zdroje uhlíku v takovém množství, aby koncentrace produktu v médiu dosáhla hodnoty 17 až 40 g/l (L-lys-HCl). Jako plně asimilovatelných zdrojů uhlíku je možno použít sacharózu, glukózu, laktózu, těkavé mastné kyseliny (např. kyselinu octovou nebo máselnou) a etanol. Pro praktické zkoušky používali autoři fermentory s pracovním objemem 30 m<sup>3</sup> (inokulační fermentor 5 m<sup>3</sup>). S použitím melasy jako zdroje uhlíku i aminokyselin a biostimulatorů (celková doba zdržení 31 h) dosáhli na výstupu ze systému koncentrace 27 g/l lysinu (výtěžek 32,2 %). Při kombinovaném dávkování melasy a sacharózy a použití kukuřičného výluhu jako zdroje aminokyselin a stimulatorů procesu dokonce 35,7 g/l lysinu (výtěžek 36 %). Použití melasy, kyseliny octové a kukuřičného výluhu vedlo k akumulaci 33,2 g/l aminokyselin. Podobně jako v předešlých případech nejsou ani v této práci bližší údaje o vlastnostech používané kultury a jejím chování během kontinuální kultivace.

Přehled prací a poznatků sovětských pracovníků o kontinuální biosyntéze lysinu je stručně shrnut v monografii autorů Mežinja *et al.* (1974), zabývající se obecně teorií a praktikou kontinuálních kultivací. Pro vědeckovýzkumné a konstrukční práce (stavba aparatury) se používá homoserindependentní mutanta *Brev. sp. 22*, s níž konali pokusy v chemostatu při limitaci uhlíkem a kyslíkem Beker a Mežinja (1968 a, b) a Ermužja *et al.* (1968). Metodami vícefaktorového plánování pokusů bylo objasněno působení základních parametrů vnější půdy jako intenzity aerace, koncentrace základního energetického zdroje (melasa), pH půdy a teploty při různých rychlostech průtoku (Ermužja a Mežinja, 1968; Ermužja *et al.* 1974). Byly zjištěny optimální hodnoty těchto faktorů a dokázána vzájemná souvislost. Zjištěné závislosti umožňují řídit proces růstu kultury v rozsahu koncentrací biomasy 1,8 až 13,7 g/l cestou komplexní změny faktorů vnější půdy a dosáhnout produktivity systému až 2,4 g/l.h (Mežinja, 1969). Byly studovány přechodné periody při změně základních parametrů kontinuálního systému a vlastnosti samoregulace kultury při vytvoření rovnovážného stavu v chemostatu (Mežinja, 1974, 1975). Bezborodov *et al.* (1973) a Beker *et al.* (1973) sledovali vliv parciálního tlaku kyslíku a intenzity míchání na některé ukazatele biochemické aktivity kultury. S cílem dosáhnout řízeného procesu biosyntézy lysinu se studují morfologické, biochemické a fyziologické závislosti při různých podmínkách kultivace (Beker *et al.*, 1970, 1971; Mežinja *et al.*, 1972; Rukliša, 1974). Prokázalo se, že v závislosti na specifické růstové rychlosti v kontinuální kultuře, stejně i v jednorázové kultuře, se mění poměr aktivity enzymů glykolýzy a cyklu trikarboxylových kyselin (CTK). Fyziologicko-biochemická charakteristika kultury se mění v závislosti na koncentraci sacharidu v půdě. Charakter metabolismu buněk při změně koncentrace cukru v půdě je určen intenzitou míchání. Maximální specifická růstová rychlost byla porovnána při intenzitě spotřeby sacharidů 0,4 g/h.g

biomasy a  $\left(\frac{dP}{dt} \cdot \frac{1}{X}\right)_{max}$  (maximální specifická rychlost produkce lysinu) při rychlosti spotřeby 0,22 g/h.g [ $pO_2 = 0,01$  MPa (0,1 at)]. Předpokládá se, že syntéza lysinu je regulována intenzitou metabolismu přes CTK. Získávání lysinu kontinuální kultivací poskytuje značné rezervy pro zvýšení efektivity výroby. Produktivita aparatury ve stadiu přípravy inokula se zvyšuje 6krát, ve stadiu vlastní fermentace 2 až 3krát. Některé nevýhody kontinuální aparatury, vyplývající především z její složitosti by měly být kompenzovány intenzifikací výrobního procesu (Mežinja et al., 1974).

Z přehledu je zřejmé, že v posledních letech se zvláště v SSSR věnuje značná pozornost výzkumu a použití kontinuální kultivace ve zmiňovaném odvětví mikrobiologického průmyslu. Přes značné úsilí a dílčí úspěchy nenašel však tento způsob ve výrobě aminokyselin doposud širší použití. Používané auxotrofní mutanty, bohaté kultivační půdy, kultivační pH v okolí hodnoty 7 i vlastní podstata kontinuální kultivace představují faktory, které značně ztěžují dlouhodobé uchování vlastností příslušného produkčního mikroorganismu a především udržení sterility kontinuálního procesu. Otázku stability kultury je možno pravděpodobně řešit pouze pomocí víceetapových mutantů. K potlačení růstu kontaminujících mikroorganismů bylo používáno široké spektrum inhibitorů chemického i biologického původu. Působení těchto sloučenin však nebylo dostatečně selektivní a ovlivňovalo negativně i produkční kmen. Tato skutečnost vedla k hledání produkčních mutantů, rezistentních k těmto látkám. Podobné kmeny, rezistentní k jedné nebo více sloučeninám antibiotického charakteru, byly již popsány, patentovány a použity pro jednorázové kultivace. Prakticky ve všech citovaných pracích zabývajících se celým procesem je navrhována 3stupňová až 4stupňová fermentace. Použití tohoto složitějšího systému doprovázejí popsané problémy v mnohem větší míře než u jednorázové kontinuální kultivace. Také z ekonomického hlediska představuje tato aparatura značné pořizovací náklady na vlastní fermentory i doplňková zařízení (pumpy, regulace teploty, objemu, pH, hladiny rozpuštěného kyslíku atd.). Je možno očekávat, že v praxi použitelný kontinuální systém bude představovat kompromisní řešení mezi jednorázovou a víceetapovou kontinuální kultivací.

## Literatura

- [1] BEKER, M. E., MEŽINJA, G. R.: Upravljajemyj biosintez, Krasnojarsk, 1968 a, s. 186.
- [2] BEKER, M. E., MEŽINJA, G. R.: Materialy po voprosam mikrobiologičeskogo polučeniija i primeneniija aminokislot, Zinatne, Riga, 1968 b, s. 20.
- [3] BEKER, M. E., MEŽINJA, G. R., RUKLIŠA, M. P.: 1. sjezd Vsesojuznogo mikrobiologičeskogo obščestva, Minsk, 1971.
- [4] BEKER, M. E. et al.: Adv. Microbial Eng., Symp., Mariánské Lázně, 1972, Proc., 1973, s. 233.
- [5] BEZBORODOV, A. M., RUKLIŠA, M. P., MEŽINJA, G. R.: Mikrobiologičeskaja promyšlennost' 1, 1973, s. 36.
- [6] DAVYDOVIC, T. I., PESURKIN, N. S., SOMOVA, L. A.: Fermentacija, Zinatne, Riga, 1974, s. 74.
- [7] ERMUJZA, A. A., MEŽINJA, G. R.: Materialy po voprosam mikrobiologičeskogo polučeniija i primeneniija aminokislot, Zinatne, Riga, 1968, s. 4.
- [8] ERMUJZA, A. A., MEŽINJA, G. R., BEKER, M. E., POPOV, P. I.: Upravljajemyj biosintez, Krasnojarsk, 1968, s. 185.
- [9] ERMUJZA, A. A., MEŽINJA, G. R., POPOV, T. P.: Biosintez i vydelenie metabolitov, Zinatne, Riga, 1974.
- [10] ERMUJZA, A. A., MEŽINJA, G. R., POPOV, P. I.: Biosintez i vydelenie mikrobiologičeskogo polučeniija i primeneniija aminokislot, Zinatne, Riga, 1972, s. 13.
- [11] MEŽINJA, G. R.: Tezisy dokladov Naučnoj konferencii po biosintezu lizina i glutamovoj kisloty, Jerevan, 1969, s. 18.
- [12] MEŽINJA, G. R., CEDERE, E. V.: Mikrobiologičeskaja promyšlennost' 1, 1973, s. 36.
- [13] MEŽINJA, G. R., RUKLIŠA, M. P., SELGA, S. E.: Proc. 4th Internat. Ferment. Symp., Tokyo, 1972.
- [14] MEŽINJA, G. R. et al.: patent SSSR č. 258 845, 1973.
- [15] MEŽINJA, G. R. et al.: Teorija i praktika nepreryvnogo kultivirovaniija mikroorganizmov, Nauka, Moskva, 1974.
- [16] MEŽINJA, G. R.: Biosintez i vydelenie metabolitov, Zinatne, Riga, 1974.
- [17] MEŽINJA, G. R.: Biosintez i vydelenie mikrobiologičeskogo polučeniija i primeneniija aminokislot, Zinatne, Riga, 1975, s. 68.
- [18] NALIMOV, V. V., CERNOVA, N. A.: Statističeskije metody planirovaniija ekstremal'nych eksperimentov, Nauka, Moskva, 1965.
- [19] RUKLIŠA, M. P.: Kandidátská disertační práce, Inst. Mikrobiol. AV LSSR, Riga, 1974.
- [20] SHIO, Y., SANO, K.: J. Gen. Appl. Microbiol. 15, 1969, s. 267.
- [21] SLEŽAK, J. et al.: Proc. 4th Symp. Continuous Cult., Prague, 1969.
- [22] VIESTURE, Z. A. et al.: patent ČSSR, PV 125-74, 1976.
- [23] ZARAK, V. A.: patent SSSR č. 225 161, 1973.

**Pilát, P.: Využití kontinuální kultivace při biosyntéze aminokyselin. II. L-lysin. Kvas. prům. 23, 1977, č. 4, s. 84–86.**

Při výzkumu mikrobiální syntézy aminokyselin je věnována největší pozornost lysinu. V posledních letech je zvláště v SSSR intenzivně studován kontinuální proces. Používané auxotrofní mutanty, bohaté kultivační půdy, kultivační pH v okolí hodnoty 7 i vlastní podstata kontinuální kultivace představují faktory, které značně ztěžují dlouhodobé uchování vlastností produkčního mikroorganismu a udržení sterility kontinuálního procesu. Použití 3stupňové a 4stupňové kontinuální systémy svou složitostí tyto problémy dále prohlubují.

**Пилат, П.: Применение непрерывной культивации для биосинтеза аминокислот. II. L-лизин. Квас. прум. 23, 1977, № 4, стр. 84–86.**

Во время исследования микробиологического синтеза аминокислот уделяется самое большое внимание L-лизину. В течение последних годов особенно в Советском Союзе исследователи интенсивно занимаются непрерывным процессом. Применяемые ауксотрофные мутанты, богатые среды, значение pH около 7 и настоящее существо непрерывной культивации, представляют факторы, которые значительно затрудняют долговременное сохранение свойств производственного микроорганизма и сохранение стерильности непрерывной культивации. Предлагаемые 3–4-ступенчатые системы своей сложностью эти проблемы далее углубляют.

**Pilát, P.: The Use of Continuous Cultivation during Biosynthesis of Amino Acids. II. L-lysine. Kvas. prům. 23, 1977, No. 4, pp. 84–86.**

In the research of microbial synthesis of amino acids, the most attention has been devoted to L-lysine. In course of recent years the continuous process has been intensively studied particularly in USSR. The auxotroph mutants used, rich cultivation broths, pH-value round 7 as well as the proper princip of continuous cultivation are factors that make a long-terms maintenance of properties of the production microorganisms and the maintenance of the continuous cultivation sterility considerably difficult. The complexity of the 3–4 -stage systems proposed, intensifies these problems father on.

**Pilát, P.: Verwendung der kontinuierlichen Kultivierung für die Biosynthese der Aminosäuren. II. L-Lysin. Kvas. prům. 23, 1977, No. 4, S. 84–86.**

Bei der Forschung der mikrobiellen Synthese der Aminosäuren wird die größte Aufmerksamkeit dem Lysin gewidmet. In den letzten Jahren wird besonders in der UdSSR der kontinuierliche Proceß intensiv studiert. Die Verwendung der Auxotrophmutanten, reiche Nährboden, pH der Kultivierung in der Umgebung des Wertes 7 und das eigentliche Wesen der kontinuierlichen Kultivierung stellen Faktoren dar, die das langfristige Erhalten der Eigenschaften des Produktionsstammes und die Erhaltung der Sterilität des kontinuierlichen Processes beträchtlich erschweren. Die angewandten komplizierten 3 bis 4-stufigen Systeme vertiefen diese Probleme noch weiter.