Mikrobiální produkce L-lysinu na bázi etanolu a kyseliny octové

547.766.4
663.18 547.292
547.262

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

Do redakce došlo 1. září 1976

Celosvětový trend, charakterizovaný snahou nahrazení tradičních, převážně zemědělských surovin sacharidické povahy netradičními substráty pro využití v mikrobiologickém průmyslu je motivován především důvody ekonomické povahy a dostupností jednotlivých zdrojů. Tato snaha se projevila již před 10 až 15 léty při hledání levných zdrojů uhlíku a energie pro kultivace mikroorganismů s cílem získat mikrobiální bílkoviny pro krmnou i humánní potřebu. Dostatečně široké spektrum substrátů pro tyto účely poskytla petrochemie a první zkoumanou skupinou byly uhlovodíky (n-alkany, n-alkeny, cykloparafiny, aromáty, alkylaromáty, různé frakce destilace a zpracování ropy). Ačkoliv výsledky byly z fermentačního hlediska perspektivní, nerozšířila se aplikace těchto substrátů, protože řada problémů povahy bioinženýrské a hygienické nebyla doposud vyřešena uspokojivě. Další skupinou látek z oblasti petrochemie jsou nižší alifatické alkoholy, metanol a etanol, které mají z fyzikálně chemického hlediska ve srovnání s uhlovodíky značné přednosti. Technologie kvasničných bílkovin na bázi etanolu je prakticky vypracována a v posledních letech se zájem výzkumných pracovníků ve světě soustřeďuje také na metanol. Přes všechny přednosti je použití nižších alkoholů doprovázeno též řadou problémů, souvisejících především s jejich toxicitou. V posledních letech se rychle zvýšil zájem o použití petrochemických surovin také v ostatních odvětvích mikrobiologického průmyslu. Jde především o fermentač-

ní výrobu aminokyselin. Z literárních a patentových údajů vyplývá, že již byly použity substráty *uhlovodíkového typu* (řada patentů, např. franc. patenty č. 1 499 336 z roku 1966, 2 120 633 z r. 1972, 2 194 776 a 2 219 225 z r. 1974 atd.), *metanol* (franc. patent č. 2 225 514 z roku 1974, NSR patenty č. 2 417 336 a 2 417 337 z r. 1974), *etanol* (viz tuto práci), *kyseliny octové* (viz tato práce), *propionová* (VB patent č. 1 300 654 z r. 1972), *benzoová* (franc. patent č. 2 137 769 z r. 1972) a *etylén* (japonský patent č. 60 147/68 z r. 1973). Práce se omezuje pouze na fermentační výrobu L-lysinu na bázi etanolu a kyseliny octové.

Základními problémy využívání C_2 substrátů jako zdroje uhlíku a energie se zabývali Mor a Fiechter (1968). Předložené schéma (obr. 1) vychází z jejich nálezů a je platné pro etanol a s největší pravděpodobností i pro kyselinu octovou jako substráty. Z údajů Kornberga (1966) vyplývá, že dráha B je kontrolována intracelulární koncentrací fosfoenolpyruvátu, který nejen inhibuje aktivitu izocitrátové lyázy (zpětnovazebný mechanismus), ale je také represorem její syntézy. Metabolické dráhy, znázorněné na schématu, již předpokládali Shio et al. (1959), kteří studovali využívání kyseliny octové bakteriemi. Prokázali, že kyselina octová vstupuje do cyklu kyseliny citrónové a cyklu kyseliny glyoxalové. Rosenberg (1974) studoval možnosti náhrady sacharidického zdroje uhlíku (glukóza) etanolem s použitím kmene *Micrococcus glutamicus* ATCC 13 287. Za sle-

Obr. 1. Metabolická dráha vstupu etanolu a kyseliny octové do cyklu kyseliny citrónové.

dovaných podmínek (dávkování sacharidu na počátku procesu a po poklesu hladiny kontinuální dávkování etanolu) se stoupajícím zastoupením etanolového uhlíku výťažek lysinu klesal. Současně se zvyšoval nárůst kultury. Pouze při 25% náhradě bylo dosaženo výtežku aminokyseliny ekvivalentního čisté glukóze. Autor usoudil, že z hlediska biosyntézy lysinu není etanolový uhlík rovnocenný uhlíku glukózovému a diskutoval tyto rozdíly na úrovni katabolické a anabolické části metabolismu kultury. Růst i produkce lysinu doprovází spotřeba C_4 -složek (oxalacetát, popř. fumarát) z Krebsova cyklu. Pro udržení této funkce cyklu musí být zajištěn přísun jejich prekurzorů. U glukózy je tohoto efektu dosaženo karboxylací vznikajícího fosfoenolpyruvátu. Při použití etanolu je vznik uvedených prekurzorů zajištěn činností dvou enzymů, izocitrátové lyázy a malátové syntetázy, které umožňují prostřednictvím glyoxalátového cyklu vstup etanolu do anabolických reakcí (viz dráha B na schématu). Etanol se však také zúčastní cyklu kyseliny citrónové k získávání energie (dráha A). Kornbergovým nálezem vysvětlil Rosenberg nízkou spotřebu etanolu v přítomnosti glukózy. Se spotřebou tohoto sacharidu klesá i hladina fosfoenolpyruvátu. Také Šruma (1974) potvrdil, že se vzrůstající náhradou sacharidického uhlíku (sacharóza) etanolem klesá produkce lysinu a stoupá množství produkované biomasy. Při úplné náhradě sacharózy byl pozorován pouze značný nárůst kultury. Ze srovnávacích experimentů usoudil, že podmínky pro fermentaci na tradičních surovinách nejsou vyhovující pro produkci z etanolu. Navrhl stanovení optimálních podmínek fermentace pro jednotlivé stupně náhrady sacharózy etanolem a současně studium vlivu aerace a složení kultivační půdy. S použitím kmene *Brevibacterium flavum* ATCC 21 127 studovala Kopecká (1975) průběh produkce lysinu na bázi glukózy, sacharózy, kyseliny octové a etanolu. Při použití octanových iontů jako zdroje uhlíku byl sledován vliv molárního poměru kyseliny octové a octanu amonného (kontinuální dávkování) na biosyntézu lysinu. Nejvyšší produkce aminokyseliny i nejvyššího nárůstu kultury bylo dosaženo při použití poměru 1 : 0,25. Těmito výsledky byly potvrzeny literární údaje (např. francouzský patent č. 2 033 119, 1970 viz dále). Růst kultury za těchto podmínek byl stej-

ný jako při použití glukózy, akumulace lysinu byla však o 1/3 nižší. U etanolu byl zejména sledován vliv jeho koncentrace v médiu na tvorbu lysinu (hladina byla udržována na konstantní úrovni automatickým analyzátozem etanolu). Se zvyšující se koncentrací alkoholu (v měřeném rozmezí 0,21–0,77 % hm.) nárůst biomasy klesal a nejvyšší produkce lysinu byla naměřena při 0,35 % hm. etanolu. V závěru práce byla srovnána produkce lysinu z jednotlivých substrátů. Za použitých kultivačních podmínek a po přepočtu na ekvivalentní množství uhlíku (100 g) bylo získáno z glukózy 33,8, sacharózy 45,9, kyseliny octové 24,2 a etanolu 27,3 g lysinu. Jelikož výzkum v tomto oboru přímo sleduje zájmy výrobních podniků, objevují se odborné práce v běžné literatuře zřídka. Výsledky výzkumných prací je možno nalézt v patentové literatuře. Světovou špičku v oblasti fermentační biosyntézy aminokyselin představují japonské firmy Ajinomoto a Kyowa, v menší míře Kanegafuchi a Kabushiki. Japonská patentová literatura není v současné době dostupná, a proto je možné studium pouze na základě patentů, udělených těmto firmám v jiných zemích. Nejstarším patentovým spisem, chránícím fermentační postup výroby L-lysinu na bázi etanolu, je švýcarský patent č. 492 783 (1970, Kyowa). Mikroorganismy, zahrnuté do spisu jsou mutanty *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Bacillus megatherium*, *Arthrobacter paraffineus* a *Nocardia*. Etanol je uvažován jako hlavní zdroj uhlíku a je přidáván na počátku kultivace nebo v jejím průběhu v celkovém množství 10 až 200 g/l. Jednotlivé kultury, jejichž použití je doprovázeno specifickým nutričním požadavkem, byly schopné syntetizovat 2,3 až 5,6 g/l krystalického L-lysin-monohydrochloridu (dále L-lysin-HCl). Tomuto spisu částečně odpovídá britský patent č. 1 200 587 (1970, Kyowa). V práci se předpokládá použití syntetického nebo přirozeného média s přidávkou esenciálních látek. Jako hlavní zdroj uhlíku je používán etanol, který může být kombinován s dalšími zdroji sacharidické povahy, glycerolem nebo jinými zdroji (kyseliny octové, mléčná a pyrohroznová). Tyto zdroje mohou být použity jednotlivě nebo ve směsi dvou i více komponent. V příkladech je uvedena pouze biosyntéza na bázi samotného etanolu, vedoucí k nahromadění 2,3 až 8,4 g/l aminokyseliny. Francouzský patent č. 2 021 688 (1970), britský patent č. 1 241 901 (1971) a švýcarský patent č. 544 810 (1974) firmy Kyowa se týkají izolace a použití nových mutant, syntetizujících lysin při použití uhlovodíků a etanolu jako zdrojů uhlíku. Ozářením (UV) výchozího kmene *Nocardia* sp. ATCC 21 430 byly získány nové mutanty *Nocardia* sp. ATCC 21 337 a 21 338. Etanol, použitý jako jediný zdroj uhlíku je dávkován v koncentraci 5 až 10 % hm., přičemž je zdůrazněno jako výhodné dávkování po 1 % hm. Překročení této hranice doprovázely inhibiční jevy. Uvedeným postupem bylo dosaženo akumulace až 12,1 g/l, při dávkování směsi parafinů a etanolu 16,5 g/l aminokyseliny. Podle britského patentu jsou jako hlavní zdroj uhlíku uvažovány uhlovodíky, které mohou být nahrazeny etanolem maximálně z 50 %. V roce 1972 patentovala v NSR široce specifikovaný postup fermentační výroby L-lysinu a L-izoleucinu za použití mutantů *Arthrobacter alcanicus* 109 (ATCC 21 657) firma Kanegafuchi (patent č. 2 136 317). Jako zdroje uhlíku jsou uvažovány alifatické uhlovodíky, mastné kyseliny, kyselina octová, jantarová, fumarová, citrónová atd., etanol a n-propanol. Přídavek kyseliny asparagové měl pozitivní vliv na výtežek procesu. Kultivace použitého mutantu v médiu s etanolem jako zdrojem uhlíku, dávkováním po částech v celkové koncentraci 50 g/l vedla k akumulaci 6,0 g/l lysinu a 2,1 g/l izoleucinu. Dalším západo-německým patentem je fermentační postup výroby lysinu firmy Ajinomoto z roku 1973 (č. 2 321 461, též franc.

patent č. 2 182 211 z téhož roku). Do patentových spisů je zahrnuto celkem 19 kmenů *Brev. lactofermentum*, *Coryn. glutamicum*, *Coryn. lilium* a *Coryn. acetoacidophilum*. Jako zdroj uhlíku jsou používány sacharidy, kyselina octová a etanol. Dávkováním směsi glukózy a etanolu do počátku procesu a dalším přidáváním samotného alkoholu v průběhu fermentace bylo dosaženo po 48 hodinách koncentrace až 66 g/l L-lysinu-HCl (odpovídá 26 % výtěžku, vztaženo na dodaný etanol). Této hodnoty bylo dosaženo v 300 ml fermentoru.

Dalším perspektivním substrátem petrochemické povahy pro využití k mikrobiální syntéze L-lysinu je kyselina octová. Také při aplikaci tohoto zdroje uhlíku pokročily nejdále uvedené japonské firmy. V roce 1970 byl udělen firmě *Ajinomoto* francouzský patent (č. 2 033 119) na fermentační výrobu lysinu na bázi kyseliny octové. Autoři patentu použili kultury *Brev. flavum* a *lactofermentum*, *Coryn. acetoacidophilum* a *Micrococcus glutamicus*. Jako hlavní zdroj uhlíku jsou uvedeny octanové ionty (kyselina octová nebo směs kyseliny octové a octanu amonného). Režim přidávky octanových iontů byl upraven tak, aby koncentrace substrátu nepřekročila hladinu 1,5 % hm. K dosažení dobrého výtěžku lysinu byly během procesu přidávány vhodné sacharidy glukóza, melasa, hydrolyzát škrobu. Za těchto podmínek bylo dosaženo 25 až 33 % konverze na produkt. Prvním britským patentem (č. 1 257 156, 1971) je postup podle firmy Kyowa, zabývající se více fermentačními podmínkami (sterilita) než vlastní produkcí lysinu. Výběrem ze směsi mutantů získaných indukovanou mutací dusitanu sodného a N-metyl-N'-nitro-N-nitrozoguanidinu UV světlem, získali autoři 4 mutanty *Coryn. glutamicum* a 2 mutanty *Brev. flavum*, rezistentní k antibiotikům. Mezi hlavními zdroji uhlíku je uvedena také kyselina octová. Ve stejném roce patentovala ve Velké Británii postup fermentační výroby lysinu také firma *Ajinomoto* (č. 1 258 380). Použité produkční kmeny byly schopny při použití kyseliny octové akumulovat až 3,77 g/l L-lysinu-HCl. Z roku 1972 pochází patent VB č. 1 300 654 firmy *Kabushiki*. Autoři patentu zjistili, že auxotrofní mutant *Coryn. acetophilum* hom-73 je schopen na bázi kyseliny octové a dalších sloučenin akumulovat lysin. Podobně jako většina ostatních auxotrofních mutantů vyžaduje kmen k růstu homoserin nebo směs aminokyselin, které jej nahradí (např. threonin + methionin). Pro produkci lysinu je také nutná přítomnost biotinu. Podle autorů může všechny tyto požadavky splnit přídatek kvasničného extraktu. Kultura byla schopna v kultivačních baňkách nahromadit až 26 g/l L-lysinu-HCl s 24 % výtěžkem. Západoněmecký patent č. 2 100 159 (1972) byl udělen firmě *Ajinomoto* a týká se využívání kyseliny octové a octanů k produkci lysinu použitím nových mutantů *Brev. flavum* a *lactofermentum*, *Coryn. acetoacidophilum* a *Micrococcus glutamicus*. Při jednorázovém dávkování substrátu na počátku fermentace bylo možno dosáhnout akumulace lysinu pouze na hodnoty 4 až 9 g/l (25 až 40 % využití kyseliny octové). Značně vyšších koncentrací produktu bylo dosaženo kontinuálním nebo semikontinuálním dávkováním směsi kyseliny octové a zdroje dusíku, zvláště směsi kyseliny octové a octanu amonného během procesu tak, aby koncentrace octanových iontů nepřestoupila hranici 1,5 % hm. a pH bylo udržováno mezi hodnotami 7,0 až 8,5. Tento způsob dávkování substrátů má značné výhody pro průmyslové využití, protože množství vedlejších produktů (jiné aminokyseliny) je nepatrné a syntéza L-lysinu tímto postupem s kyselinou octovou jako hlavním výchozím materiálem je jednoduchá. Důležitý je molární poměr kyseliny octové a octanu amonného. Použitím optimální směsi (1:0,25) bylo dosaženo akumulace lysinu až na hodnotu 82 g/l a 30% konverzí substrátu (300 ml skleněný

fermentor). Dále bylo zjištěno, že ke zvýšení výtěžků lysinu je důležité současné dávkování sacharidů (glukóza, melasa, hydrolyzát škrobu). Jejich celkové množství nemá přestoupit 20 % (optimum je 5 až 15 %) vzhledem k celkovému množství octanových iontů. Tímto způsobem byla zvýšena akumulace lysinu v půdě až na 92,5 g/l při 33,8 % výtěžku z dodaného substrátu (kyselina octová a glukóza). Této práci je podobný sovětský patent stejné firmy z roku 1974 (č. 448 848). Týká se pouze jedné z uvedených mutantů (*Brev. flavum* ATCC 21 129). Jako optimum molární směsi kyseliny octové a octanu amonného je uveden poměr 1:0,1—0,5. Při vyšším obsahu octanu stoupá koncentrace zbytkové kyseliny a produkce lysinu klesá a v opačném případě je poměr uhlík : dusík nevýhodný pro produkci aminokyseliny. Další německý patent firmy *Ajinomoto* pochází z roku 1973 (č. 2 321 461) a týká se fermentační výroby lysinu ze sacharidů, etanolu a kyseliny octové za použití 19 bakteriálních mutantů již uvedených v části o etanolu. Za podobných kultivačních podmínek jako v předešlém případě s dávkováním glukózy pouze na počátku procesu bylo dosaženo akumulace až 71 g/l L-lysinu-HCl.

Podstatou československého patentu, uděleného sovětským pracovníkům (*Viesture et al.* PV 125—74) v roce 1976 je regulace růstu a biosyntézy lysinu u produkčního kmene (*Brev. sp. 22 a 22L*) na sacharidickém zdroji uhlíku a kyselině octové v periodické i kontinuální kultivaci. Autoři vycházejí ze skutečnosti, že při dosavadním používaném způsobu biosyntézy lysinu se během procesu využíváním složek živné půdy oduchuje prostředí o důležité látky, jako jsou aminokyseliny, potřebné pro růst kultury a stimulatory biosyntézy lysinu. Toto ochuzování způsobuje stárnutí kultury, nastává autolýza, snižuje se počet živých buněk a klesá aktivita enzymů. V souvislosti s tím klesají i výtěžky lysinu. Přídatek potřebných aminokyselin do živné půdy ve zvýšeném množství od počátku kultivace vyvolává inhibiční jevy, které přerušují biosyntézu lysinu. Cílem práce je odstranit tyto nedostatky regulací probíhajícího procesu tak, aby kultura produkčního kmene byla během celé kultivace udržena v aktivním stavu a výtěžky lysinu se zvýšily. Podle vynálezu se po dosažení koncentrace buněk, která je optimální pro výtěžek produktu, přidávají ke kultivační kapalině periodicky nebo kontinuálně aminokyseliny potřebné pro růst kultury (threonin a methionin) a stimulatory biosyntézy lysinu (thiamin a biotin) nebo zdroje těchto látek v takovém množství, aby koncentrace buněk v médiu zůstala na této úrovni. Tato úprava má zvýšit výtěžek lysinu o 20 %. Jako zdrojů popsaných látek je možno účelně použít kukuřičný extrakt, melasu, hydrolyzát z kvasnic nebo arašídové mouky. Ke zvýšení koncentrace lysinu se po dosažení optimální koncentrace buněk přidávají periodicky nebo kontinuálně plně asimilovatelné zdroje uhlíku (sacharidy nebo kyselina octová) v takovém množství, aby hladina produktu v médiu dosáhla hodnoty 17—40 g/l (L-lysin-HCl). Tímto způsobem bylo v jednorázové kultivaci (fermentor o obsahu 10 l) získáno 23,4 g/l aminokyseliny (glukóza do počátku, v průběhu procesu přidávky kyseliny octové). V třístupňové kontinuální kultivaci (fermentory o pracovním objemu po 30 m³) s použitím melasy a kyseliny octové bylo naměřeno na výstupu ze systému 33,2 g/l produktu. Podrobný rozbor zmíněné víceetapové kontinuální kultivace je uveden v práci *Pilátá* (1977).

Z předložených údajů je zřejmé, že použití nových substrátů, etanolu a kyseliny octové, zvláště potom v kombinaci s klasickými surovinami je značně perspektivní a také v ČSSR je tomuto problému věnována značná pozornost. Využívání uvedených zdrojů bude však vázáno jejich dostupností a současnou cenou. Efektivní zvládnutí celého procesu biosyntézy lysinu je nejen otáz-

kou nalezení optimálního technologického režimu, ale především získání vhodného produkčního mikroorganismu.

Literatura

- [1] KOPECKÁ, H.: Využití netradičních surovin při biosyntéze L-lysinu. IV. Optimalizace kultivačních podmínek, diplomová práce, VŠCHT, Praha, 1975.
- [2] KORNBERG, H. L.: Biochem. J. **99**, 1966, s. 1.
- [3] MOR, J. R., FIECHTER, A.: Biotechnol. Bioeng. **10**, 1968, s. 159.
- [4] PILÁT, P.: Kvas. prům. **23**, 1977, č. 1, s. 84.
- [5] ROSENBERG, I.: Využití netradičních surovin pro biosyntézu L-lysinu. I. Náhrada sacharidického zdroje etanolem, diplomová práce, VŠCHT, Praha, 1974.
- [6] SHITO, I., MITSUGI, K., TSUNODA, T.: J. Biochem. **46**, 1959, s. 1685.
- [7] ŠRUMA, T.: Využití netradičních surovin pro biosyntézu lysinu. II. Využití optimálního poměru použitých substrátů z hlediska zvýšení produkce L-lysinu, diplomová práce VŠCHT, Praha, 1974.

Pilát P.: Mikrobiální produkce L-lysinu na bázi etanolu a kyseliny octové, Kvas. prům. 24, 1978, č. 3, s. 67—70.

Podobně jako při výrobě mikrobiálního proteinu SCP, pronikají také do fermentační výroby aminokyselin snahy použít petrochemických surovin. Kromě uhlovodíků patří mezi nejperspektivnější syntetický etanol a kyselina octová. Použitím nových produkčních mikroorganismů a technologických postupů bylo při biosyntéze L-lysinu dosaženo již výsledků, srovnatelných se sacharidickými zdroji.

Пилат, П.: Микробиологическое производство L-лизина на базе этилового спирта и уксусной кислоты. Квас. прум. 24, 1978, № 3, стр. 67—70.

Подобно как в случае производства микробного белка проникают в ферментационное производство аминокислот стремления применять тоже петрохимические

сырья. Кроме углеводов являются самыми перспективными синтетический этиловый спирт и уксусная кислота. С помощью новых производственных микроорганизмов и технологических процессов было в случае биосинтеза L-лизина достигнуто уже таких результатов, которые позволяют сравнение с сахаридическим сырьём.

Pilát P.: The Microbial Production of the L-lysine Based on Ethanol and Acetic Acid. Kvas. prům. 24, 1978, No. 3, pp. 67—70.

Similarly as in the case of the production of microbial proteins (SCP), the efforts to employ the petrochemical raw materials penetrate even to fermentation production of amino acids. The synthetic ethanol and the acetic acid, belong besides hydrocarbons, to the most promising substrates. The results comparable to sacharidic sources have been reached already as for the L-Lysine biosynthesis by means of new production microorganisms and technological processes.

Pilát P.: Mikrobielle Produktion des L-Lysins auf der Äthanol-Essigsäure-Basis. Kvas. prům. 24, 1978, No. 3, S. 67—70.

Ähnlich als im Fall der Produktion des mikrobiellen Proteins dringen die Bestrebungen um die Ausnutzung der petrochemischen Rohstoffe in die fermentative Erzeugung der Aminosäuren durch. Zu den perspektiven Substraten gehören außer Kohlenwasserstoffen synthetischer Ethanol und synthetische Essigsäure. Mittels neuer Produktionsstämme und technologischen Verfahren wurden während der L-Lysinbiosynthese die Ergebnisse erreicht, die mit dem Gebrauch der sacharidischen Quellen vergleichbar sind.