

Biosyntéza L-lysinu na bázi hydrolyzátu dřeva a kyseliny octové u kmenů *Corynebacterium glutamicum*

Ing. JANA PELECHOVÁ, CSc., Vysoká škola chemicko-technologická, Praha;
RNDr. FRANTIŠEK SMĚKAL, CSc., PhDr. VLADIMÍR BULANT, Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy;
Prof. Ing. VLADIMÍR KRUMPHANZL, DrSc., Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha.

Nedostatek klasických zdrojů uhlíku pro fermentační přípravu důležitých metabolitů vede k hledání nových kultivačních postupů využívajících „náhradních“ a často levnějších uhlíkatých surovin, jako je syntetický ethanol, kyselina octová apod. Perspektivním se v současné době zdá použití hydrolyzátu dřeva a některých celulosových odpadů připravených perkolační nebo kontinuální kyselou hydrolyzou. Základní cukerné složky těchto hydrolyzátů jsou glukosa, manosa, galaktosa a rhamnosa; z pentos xylosa, arabinosa, ribosa a v malém množství ketopentosa. Kromě těchto byla v hydrolyzátech zjištěna také přítomnost disacharidů a oligosacharidů. Někteří autoři uvádějí, že produkční kmeny L-lysinu korynebakterií a brevibakterií využívají z těchto monosacharidů přednostně glukosu, manosu a fruktosu, z disacharidů pouze sacharosu a maltosu. Pentosa jsou využívány velmi slabě nebo vůbec ne [1, 2].

Současně s probíhající hydrolyzou polysacharidů nastává rozklad vznikajících monosacharidů. Z pentos vzniká relativně stálý furfural, z hexos málo stálý oxymethylfurfural, který se rychle rozkládá na kyselinu levulovou, mravenčí a huminové látky. Tyto látky působí pak při fermentačním procesu inhibičně na růst mikroorganismů [3, 4].

Aplikace hexoso-pentosového komplexu hydrolyzátu dřeva jako zdroje uhlíku pro fermentační technologii, předpokládá odlišný metodický přístup při studiu biosyntézy excesivních metabolitů oproti řešení problému na bázi klasického zdroje uhlíku: iniciační koncentrace hydrolyzátu dřeva ve fermentačním médiu musí být re-

lativně nízká vzhledem k toxickému účinku vedlejších produktů hydrolyzy; je zapotřebí stanovit množství a koncentraci hydrolyzátu dřeva v dávkovací směsi spolu s dalšími zdroji uhlíku, určit postup dávkování směsi v průběhu fermentačního procesu a stanovit optimální poměr C:N v dávkovací směsi. Výběr produkčního a geneticky stabilního kmene představuje základní předpoklad realizace fermentačního postupu na bázi hydrolyzátu dřeva a celulosových odpadů.

Předložená práce má ukázat na základní produkční charakteristiky dvou mutantních kmenů *Corynebacterium glutamicum* ve fermentačních médiích, kde uhlíkatým zdrojem je hydrolyzát dřeva. Růst kmenů a produkce L-lysinu byla nejprve sledována na modelových pokusech s jednotlivými sacharidy, jejichž přítomnost v dřevném hydrolyzátu byla chromatograficky prokázána. Vzhledem k tomu, že produkční bakteriální kmeny vyžadují pro růst a biosyntézu L-lysinu poměrně vysokou koncentraci uhlíkatého zdroje v živném médiu (20 % hm. sacharosy), bylo zapotřebí obsah redukcí-látek v hydrolyzátu dřeva buď zvýšit, a to vakuovým zahuštěním až na 10 % hm. nebo doplnit vhodným zdrojem uhlíku, jako je kyselina octová ve směsi se svými solemi nebo ethylalkohol [5, 6, 7].

MATERIÁL A METODY

Mikroorganismus: Všechny testované produkční kmeny jsou ze sbírky mikroorganismů VÚAB. Byl použit kmen *Corynebacterium glutamicum*, dependentní na ho-

moserin a resistantní k S-aminoethylcysteinu (AEC) a kmen *Corynebacterium glutamicum*, vyžadující homoserin, leucin a současně resistantní vůči S-aminoethylcysteinu; uvedené kmeny budou dále označovány jako kmen I a kmen II. Jejich morfologická a biochemická charakteristika je totožná s původním kmenem *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13287 [7]. Kmeny byly udržovány na šikmých masopeptonových agaroch pasážováním. Přeočkování kmenového materiálu se uskutečnilo po 21 dnech. Kultivace probíhala při teplotě 28 °C po dobu 48 hodin. Kmeny byly uchovány při +4 °C.

Analytické metody: L-lysin byl stanoven oscilopolarograficky [8, 9]. Kvantitativní a kvalitativní analýza sacharidů v hydrolyzátu dřeva a v kultivačních půdách byla prováděna chromatografií na tenké vrstvě [10]. Sušina buněk stanovena vážkově.

Postupy

1. Sledování růstu produkčních kmenů na agarových půdách

a) s různou koncentrací redukujících látek v hydrolyzátu dřeva; na médiu o složení: hydrolyzát dřeva 85 ml, hydrolyzát arašídové mouky 15 ml, kukuřičný extrakt 1 g, síran amonný 1 g, hydrogenfosforečnan draselný 0,1 g, síran hořečnatý $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, uhličitán vápenatý 3 g, agar (Difco) 2 g; pH média po sterilaci 7,0 až 7,2; dané množství hydrolyzáta dřeva obsahovalo 2 % hm., 3 % hm., 4 % hm. a 5 % hm. redukujících látek; kultivace probíhala na Petriho miskách s 10 ml média v termostatu při 29 °C po dobu 48 hodin;

b) s jednotlivými monosacharidy obsaženými v hydrolyzátu dřeva; modelové pokusy byly prováděny na médiu o složení: 2 % Bacto-nutrient-agaru, který byl obohacen 2 % hm. monosacharidu, a to glukosou, manosou, galaktosou, xylosou a rhamnosou; po zaočkování byly Petriho misky s 10 ml média uloženy v termostatu při 29 °C po 48 hodin.

2. Produkce L-lysinu na modelových médiích s jednotlivými cukry

Produkčními kmeny byly zaočkovány 500 ml varné baňky s 50 ml inokulačního média o složení: octan sodný 5 g, sacharosa 2 g, kukuřičný extrakt 3 g, doplněno vodou na 100 ml; pH po sterilaci 7,0–7,2. Baňky byly kultivovány na rotační třepačce (240 ot/min) po dobu 24 hodin při teplotě 29 °C. 2 ml takto vyrostlé kultury byly zaočkovány 500 ml varné baňky s 20 ml fermentačního média o složení: hydrolyzát arašídové mouky 15 ml, kukuřičný extrakt 1 g, síran amonný 1 g, hydrogenfosforečnan draselný 0,1 g, síran hořečnatý kryst. 0,01 g, vodou doplněno na 100 ml; pH po sterilaci 7,0–7,2; před zaočkováním byly do média přidány cukry ve vodných roztocích (glukosa, xylosa, manosa, galaktosa a rhamnosa), a to v koncentraci 4 % hm. Fermentační baňky byly kultivovány při 29 °C po dobu 48 hodin. Ve fermentačním médiu bylo sledováno množství lysinu, sušina buněk a jednotlivé monosacharidy.

3. Produkce L-lysinu na fermentačních médiích s hydrolyzátem dřeva

V pokusech byl používán hydrolyzát dřeva s obsahem 2,1 % hm. redukujících látek. Složení fermentačního média: hydrolyzát dřeva 85 ml, hydrolyzát arašídové mouky 15 ml, kukuřičný extrakt 1 g, síran amonný 1 g, hydrogenfosforečnan draselný 0,1 g, síran hořečnatý $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, uhličitán vápenatý 3 g; pH po sterilaci = 7,0–7,2.

V dalších pokusech bylo uvedené fermentační médium doplněno 2 % hm. octanu sodného. Obsah lysinu byl zjišťován po 48 hodinách fermentace. V 6. h fermenta-

ce bylo započato s dávkováním uhlíkatých směsí (hydrolyzát dřeva, kyselina octová a amoniak); bylo přidáno takové množství dávkovací směsi, aby pH média bylo mezi hodnotami 6,9–7,2.

Tabulka 1. Složení dřevného hydrolyzáta (% hm.)

| | | | |
|------------------|------|--------------------|------|
| redukující látky | 2,10 | minerální kyseliny | 0,63 |
| dextrin | 0,20 | organické kyseliny | 0,31 |
| furfural | 0,04 | koloidy | 0,44 |
| kyselost | 0,94 | sediment | 3,24 |

Tabulka 2. Obsah jednotlivých cukrů v hydrolyzátu dřeva (% hm.)

| | | | |
|-----------|------|-----------|-------|
| glukosa | 1,5 | rhamnosa | >0,10 |
| manosa | 0,45 | arabinosa | >0,10 |
| xylosa | 0,60 | ribosa | >0,10 |
| galaktosa | 0,10 | | |

Tabulka 3. Růst kmenů *Corynebacterium glutamicum* na médiích s různým obsahem redukujících látek za 48 h

| Produkční kmen | Redukující látky v médiu % hm. | | | |
|---|--------------------------------|---|---|---|
| | 2 | 3 | 4 | 5 |
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> , kmen I | +++ | + | — | — |
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> , kmen II | +++ | + | — | — |

Vysvětlivky: +++ velmi dobrý růst, + dobrý růst, — negativní

Tabulka 4. Hodnocení růstu kmenů *Corynebacterium glutamicum* na agarových médiích s různými zdroji uhlíku

| Produkční planem | Jednotlivé monosacharidy | | | | |
|---|--------------------------|-----|-----|-----|-------|
| | glu | man | xyl | gal | rhamn |
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> , kmen I | +++ | ++ | ++ | + | ++ |
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> , kmen II | +++ | + | ++ | + | ++ |

Vysvětlivky: +++ velmi dobrý růst, ++ dobrý růst, + slabý růst

Složení dávkovacích směsí

směs A: hydrolyzát dřeva 65 ml, kyselina octová konc. (99 % hm.) 30 ml, amoniak konc. (26 % hm.) 5 ml;

směs B: hydrolyzát dřeva 85 ml, kyselina octová konc. (99 % hm.) 15 ml, octan amonný 3,6 g, sacharosa 1–6 g. Fermentace probíhala po dobu 72 h; směs byla dávkována v intervalech 6 h tak, aby pH média bylo v rozmezí 6,9–7,2.

V práci byl používán hydrolyzát dřeva (ze závodu na výrobu krmného droždí Vl. Poptomova v Bulharsku). Složení dřevného hydrolyzáta je uvedeno v tab. 1 a obsah jednotlivých sacharidů v tab. 2.

Hydrolyzát dřeva byl po úpravě pH na hodnotu 5,7 vakuově zahuštěn na odparce, aby obsah redukujících látek stoupl na 10,5 % hm.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Produkční kmeny byly nejprve testovány na pevných půdách s různou koncentrací redukujících látek (tab. 3), a dále byl hodnocen jejich růst na půdách s jednotlivými cukry, které jsou přítomny v hydrolyzátu dřeva (tab. 4). Zaočkované živné půdy na Petriho miskách byly kultivovány 48 hodin v termostatu při 29 °C.

Z tabulky je zřejmé, že se zvýšením koncentrace re-

Tabulka 5. Základní růstová a produkční charakteristika kmene *Corynebacterium glutamicum*, I na jednotlivých monosacharidech po 48 h fermentace

| Fermentační médium + cukr | L-lysin (g/l) | sušina (g/l) | monosacharid (g/l) |
|---------------------------|---------------|--------------|--------------------|
| glukosa | 11,6 | 7,3 | 0 |
| manosa | 5,0 | 5,5 | 1 |
| xylosa | 5,4 | 5,5 | 8 |
| rhamnosa | 5,0 | 4,0 | 10 |
| galaktosa | 5,7 | 5,2 | 12 |

Tabulka 6. Produkce L-lysinu u *Corynebacterium glutamicum*, kmene I na fermentačním médiu s hydrolyzátem dřeva + 2 % hm. octanu sodného

| Fermentační médium + dávkovací směs | Produkce L-lysinu (g/l média/72 h) |
|--|------------------------------------|
| hydrolyzát dřeva + směs A | 13,5 |
| hydrolyzát dřeva + směs B (kontrola) | 12,1 |
| hydrolyzát dřeva + směs B + 1% hm. sacharosy | 11,4 |
| + směs B + 2% hm. sacharosy | 12,0 |
| + směs B + 4% hm. sacharosy | 18,7 |
| + směs B + 6% hm. sacharosy | 17,6 |

dukujících látek v zahuštěném hydrolyzáte dřeva se zkoncentrují i toxické degradační produkty (vznikající při kyselé hydrolýze dřeva), které inhibují růst obou produkčních kmenů *Corynebacterium glutamicum*.

Při hodnocení asimilační schopnosti produkčních kmenů byly k základnímu médiu přidány v koncentraci 2 % hm. tyto monosacharidy: glukosa, manosa, xylosa, galaktosa a rhamnosa.

U obou kmenů byl pozorován velmi dobrý růst pouze na glukose. Asimilace dalších monosacharidů je slabá, což se projevuje v intenzitě narostlé biomasy, a není podstatný rozdíl mezi jednotlivými cukry.

Dále byla sledována biosyntéza L-lysinu v tekutých fermentačních médiích, které obsahovaly jako zdroje uhlíku jednotlivé sacharidy přítomné v hydrolyzáte dřeva. K těmto modelovým pokusům byl vybrán z fyziologického hlediska (monoauxotrofní a monoresistentní kmen) produkční kmen *Corynebacterium glutamicum*, I; koncentrace jednotlivých sacharidů byla 4 % hm. Po 48 h fermentace bylo v kultivačním médiu stanoveno množství L-lysinu, sušina buněk a obsah jednotlivých sacharidů.

Z tabulky je zřejmé, že optimální produkce L-lysinu bylo dosaženo za 48 h fermentace v půdě s glukosou. V ostatních případech dosáhla produkce L-lysinu pouze 50 % výtěžku získaného v médiu s glukosou.

Na základě dosažených výsledků byly provedeny fermentační pokusy s hydrolyzátem dřeva jako jediným zdrojem uhlíku pro růst mikroorganismů a biosyntézu L-lysinu. Nejprve byl použit samotný hydrolyzát dřeva s obsahem 2,1 % hm. redukujících látek, v dalších pokusech byl do fermentačního média přidán v koncentraci 2 % hm. octan sodný. Za 48 h fermentace byl výtěžek L-lysinu v půdě se samotným hydrolyzátem 4,1 g/l média a v půdě s přidavkem octanu sodného 9,0 g/l média.

Pozitivní vliv acetátových iontů ukázal na možnost dávkování uhlíkatých směsí do média v průběhu fermentace. V následujících pokusech bylo proto odzkoušeno několik dávkovacích směsí, které obsahovaly zahuštěné hydrolyzáty dřeva (10,5 % hm. redukujících látek), kyselinu octovou a amoniak a v limitovaném množství sacharosu. Dávkování probíhalo od 24 h fermentace

v pravidelných intervalech 8–10 h (úprava pH 6,9–7,2). Výsledky pokusů jsou shrnuty v tabulce 6.

Výsledky pokusů poukazují na možnost zvýšit produkci L-lysinu dávkováním uhlíkatých směsí na bázi náhradních uhlíkatých zdrojů s hydrolyzátem dřeva jako základní složkou dávkovacích směsí. Při nízkých koncentracích sacharosy (1–2 % hm.) v dávkovacích směsích se prakticky neuplatňuje její vliv na produkci L-lysinu.

Testovací a fermentační pokusy s kmeny *Corynebacterium glutamicum* ukázaly, že použití hydrolyzáta dřeva jako uhlíkatého zdroje pro biosyntézu a produkci L-lysinu je reálné. Avšak vzhledem k požadavku zvýšené koncentrace uhlíkatého zdroje v kultivační půdě pro produkci L-lysinu bylo nutno řešit otázku nízké koncentrace mikroorganismy asimilovatelných látek v hydrolyzáte dřeva. Řešení tohoto problému zahušťováním hydrolyzáta z původních 2 % hm. na 10 % hm. redukujících látek vedlo také ke zvýšení obsahu toxických látek a tím k inhibici růstu a snížení produkce L-lysinu. Toto zjištění je ve shodě s autory, uvádějícími negativní vliv furfuralu a jeho derivátů na tvorbu biomasy u kvasinek [4, 11].

Zvýšení obsahu redukujících látek hydrolyzáta dřeva přidáváním dávkovacích směsí, jejichž podstatnou složkou je kyselina octová, se projevilo příznivě v produkci L-lysinu. Výsledky pokusů poukazují na významnost kvantitativního i kvalitativního složení dávkovacích směsí.

Produkční kmeny L-lysinu využívají z monosacharidů přednostně glukosu, manosu a fruktosu, z disacharidů pouze sacharosu a maltosu, pentosy jsou využívány velmi slabě nebo nejsou využívány vůbec. Schopnost utilizace pentos je zřejmě závislá především na použití genetického materiálu, dále na kultivačních podmínkách a fermentační technologii. Přítomnost dobře utilizovatelných hexos v hydrolyzáte dřeva podmiňuje asimilaci pentos z prostředí do buněk. Pokles produkce L-lysinu při aplikaci xylosy jako jediného zdroje uhlíku může být závislý na změnách enzymatických rychlostech v řadě reakcí biosynthetické dráhy L-lysinu, nebo suboptimální hladinou některých intermediátů, které mají klíčovou úlohu v biosyntéze L-lysinu, jako je kyselina pyrohroznová nebo takové metabolity, které se mohou významně uplatňovat v procesech neoglukogenes.

Řešení otázky fyziologické detoxifikace koncentrovaných hydrolyzáte dřeva může vést ke zvýšení produkce L-lysinu, event. i tvorby jiných excesivních metabolitů při fermentační aplikaci hydrolyzáta dřeva.

Literatura

- [1] ZAJCEVA, Z. M.: Úspěchy mikrobiologie, vol. 11, 1976 s. 157.
- [2] SCHIIO, I., SANO, K.: J. Gen. Appl. Microbiol., 15, 1971 s. 267.
- [3] LINKO, M.: Adv. Biochem. Eng., vol. 5, 1977 s. 27.
- [4] REESE, E. T. et al.: Adv. Biochem. Eng., vol. 2, 1972 s. 192.
- [5] Francouzský patent 2 033 119 (1971)
- [6] Patent NSR 2 100 159 (1972)
- [7] PELECHOVÁ, J., ŠRUMA, T., PLACHÝ, J., KRUMPHANZL, VL.: Sborník VŠCHT, E 49, 1977, s. 145
- [8] Patent ČSSR 118 188 (1968)
- [9] BULANT V.: Sborník příspěvků na mezinárodní konferenci na téma „Bílkoviny a jejich produkce a využití“ Praha 1965
- [10] PŮSOVÁ, H.: Diplomová práce, VŠCHT 1978
- [11] PELECHOVÁ, J., KRUMPHANZL, VL., KADLEC, K., STANĚK, J., SOKOLOV, T.: Využití dřevního hydrolyzáta se syntetickým ethanolom pro produkci krmného droždí I. Kvasný průmysl (v tisku).

Pelechová J., Smékal F., Bulant V., Krumphanzl V.: Biosyntéza L-lysinu na bázi hydrolyzáta dřeva a kyseliny octové u kmenů *Corynebacterium glutamicum*. Kvas. prům., 25, 1979, č. 8, s. 174–177.

V předložené práci byla sledována možnost náhrady klasických zdrojů uhlíku hydrolyzátem dřeva při fermentační přípravě L-lysinu. Byly testovány růstové a produkční schopnosti kmenů *Corynebacterium glutamicum* nejprve na agarových půdách s různou koncentrací redukujících látek, dále v tekutých médiích s jednotlivými sacharidy, jejichž přítomnost v hydrolyzátu dřeva byla zjištěna chromatograficky. Na základě dosažených výsledků byly provedeny fermentační pokusy, a to jednak se samotným hydrolyzátem dřeva jako jediným zdrojem uhlíku ve fermentační půdě, jednak v kombinaci s různými typy dávkovacích směsí. Podstatnou složkou těchto směsí byla kyselina octová. Použití hydrolyzátu dřeva pro biosyntézu L-lysinu je reálné. Otevře na zůstává otázka vhodného a úplného odstranění furfuralu, oxymethylfurfuralu a dalších inhibičně působících látek, jejichž negativní vliv se silně projevuje zvláště při použití zahuštěných hydrolyzátů dřeva.

Пелехова, Я. — Смекал, Ф. — Булант, В. — Крмпханцл, В.: Биосинтез левовращающего лизина штаммами *Corynebacterium glutamicum* в среде, содержащей гидролизат древесины и уксусную кислоту. Квас. прум. 25, 1979, № 8, стр. 174—177.

Авторы изучали при бродильном методе производства левовращающего лизина возможность замены классических источников углерода гидролизатом древесины. Интенсивность размножения и производительность некоторых штаммов вида *Corynebacterium glutamicum* изучались сперва на агаровой среде с разным содержанием восстанавливающих веществ, а после этого в жидких средах с разными сахарами. Присутствие сахаридов определялось хроматографически. Результаты были использованы в серии экспериментов с разным составом сбраживаемой среды. В некоторых составах единственным источником углерода был гидролизат древесины, в других были разные дальнейшие примеси, причем преобладала уксусная кислота. Можно вывести заключение о реальной возможности применения гидролизата древесины для биосинтеза левовращающего лизина, хотя некоторые вопросы остаются открытыми. Это относится к устранению фурфурола, оксиметилфурфурола и некоторых дальнейших ингибирующих соединений, негативное влияние которых обнаруживается в особенности при применении сгущенных гидролизатов древесины.

Pelechová J., Smékal F., Bulant V., Krumphanzl V.: Application of Wood Hydrolyzate and Acetic Acid to Bio-

synthesis of L-lysine Produced by Strains of *Corynebacterium glutamicum*. Kvas. prŭm. 25, 1979, 1979, No. 8, pp. 174—177.

The article deals with the preparation of L-lysine by fermentation and with the substitution of conventional carbon sources with wood hydrolyzate. Propagating and producing activities of some strains of *Corynebacterium glutamicum* were studied first on agar media with various concentrations of reducing substances and then in liquid media with several saccharides, the presence of which was ascertained by means of chromatographic methods. A series of experiments were carried out with various fermentation media ranging from wood hydrolyzate as an only source of carbon to media containing other components, including acetic acid. The results of research works confirm that the wood hydrolyzate can be used to advantage to biosynthesis of L-lysine, though several questions are still open, especially how to eliminate furfural, oximethylfurfural and some other inhibiting substances, negative influence of which is very pronounced in condensed wood hydrolyzate.

Pelechová J., Smékal F., Bulant V., Krumphanzl V.: Biosynthese des L-Lysins auf Basis des Holzhydrolysats und der Essigsäure bei den Stämmen *Corynebacterium glutamicum*. Kvas. prŭm. 25, 1979, No. 8, S. 174—177.

In dem Artikel wird die Möglichkeit des Ersatzes der klassischen Kohlenstoffquellen durch Holzhydrolysat bei der Fermentationsproduktion des L-Lysins verfolgt. Es wurde die Wachstums- und Produktionsfähigkeit der Stämme *Corynebacterium glutamicum* erstens auf Agarböden mit verschiedener Konzentration der reduzierenden Stoffe, weiter in flüssigen Medien mit verschiedenen Sacchariden, deren Anwesenheit im Holzhydrolysat chromatographisch festgestellt wurde, getestet. Aufgrund der erzielten Ergebnisse wurden Fermentationsversuche durchgeführt, und zwar mit Holzhydrolysat als einziger Kohlenstoffquelle in dem Fermentationsboden, weiter auch in Kombination mit verschiedenen Typen der Dosierungsmischungen. Diese Mischungen enthielten als wesentliches Bestandteil Essigsäure. Die Applikation des Holzhydrolysats für die Biosynthese des L-Lysins ist real. Offen bleibt die Frage des geeigneten und vollkommenen Entfernung des Furfurals, Methylfurfurals und weiterer inhibitiv wirkender Substanzen, deren negativer Einfluß sich besonders bei der Anwendung konzentrierter Holzhydrolysate stark durchsetzt.