

Lihovarství a droždářství

Biosyntéza L-lysinu na bázi hydrolyzátu dřeva a kyseliny octové u kmenů *Corynebacterium glutamicum*. I. Utilizace uhlíkatých zdrojů

RNDr. FRANTIŠEK SMÉKAL, CSc., Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

Ing. JANA PELECHOVÁ, CSc., Vysoká škola chemickotechnologická, Praha

Ing. EVA KINDLOVÁ, Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

Prof. Ing. VLADIMÍR KRUMPHANZL, DrSc., Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha

Studium fermentační přípravy L-lysinu se v současné době zaměřuje na možnost využití netradičních uhlíkatých surovin jako jsou hydrolyzáty přirozených materiálů obsahujících celulosu. Hydrolyzáty dřeva představují specifický soubor monosacharidů glukosu, manosu, galaktosu a rhamnosy; z pentos jsou zastoupeny hlavně xylosa a arabinosa. Je známa průmyslová příprava „singl cell protein“ a ethanolu na bázi hydrolyzátu celulosových odpadů [1]. Také příprava krmného droždí byla realizována na hydrolyzátech celulosových odpadů [3]. Jak uvádějí někteří autoři, mohou být pro biosyntézu L-lysinu kromě hydrolyzátního dřeva použity i hydrolyzáty rašeliny v kombinaci s melasou [2].

Práce je zaměřena na studium utilizace hexoso-pentosového komplexu sacharidů obsažených v hydrolyzátech dřeva při fermentační biosyntéze L-lysinu kmeny *Corynebacterium glutamicum*. Tím je současně sledována možnost náhrady dosud používaných klasických zdrojů uhlíku novými typy surovin (hydrolyzát dřeva v kombinaci s kyselinou octovou).

MATERIÁL A METODY

Mikroorganismy: V pokusech byly používány produkční kmeny ze sbírky VÚAB, a to *Corynebacterium glutamicum*, vyžadující homoserin a resistentní na účinek S-aminoethylcysteinu (AEC); kmen *Corynebacterium glutamicum*, vyžadující homoserin, leucin a současně AEC a kmen *Corynebacterium glutamicum*, vyžadující obě aminokyseliny a resistentní vůči aminothiomásele kyselině (AMTB); uvedené kmeny budou nadále označovány jako kmeny I, II a III. Kmeny byly udržovány na šikmých masopeptonových agarrech pasážováním. Přeočkování kmenového materiálu se uskutečnilo vždy po 21 dnech. Kultivace probíhala na rotační třepačce (240 ot/min, exc. = 25 mm) při 29 °C po dobu 72 h. Kmeny byly uchovány při 4 °C.

Tab. 1. Obsah jednotlivých sacharidů v koncentrovaném hydrolyzátního dřeva (% hm.)

glukosa	6,2	galaktosa	0,4
manos	2,1	rhamosa	0,3
xylosa	3,2		

Uhlíkaté zdroje: technická sacharosa, kyselina octová p. a. (99 % hm.), octan sodný krystalický, hydrolyzát dřeva (2,1 % hm. redukcijících látek). Složení dřevného hydrolyzátního obsah jednotlivých monosacharidů byl uveden v předchozí publikaci [12]. Hlavní složka dávko-

vací směsi, koncentrovaný hydrolyzát dřeva, byl získán takto: původní hydrolyzát dřeva s obsahem 2,1 % hm. redukcijících látek byl po úpravě pH na hodnotu 5,7 vakuově zahuštěn na odparce, aby obsah redukcijících látek stoupl asi na 10 % hm. (tab. 1).

Analytické metody: L-lysin byl stanoven spektrofotometricky [4] nebo oscilopolarograficky [5, 6]. Celkové množství redukcijících látek bylo zjištěno metodou podle Janička [7], stanovení amoniakálního dusíku titrací 0,1 N HCl [8].

POSTUPY

1. Fermentační příprava L-lysinu na bázi hydrolyzátního dřeva a kyseliny octové u kmenů *Corynebacterium glutamicum*

Produkčními kmeny byly zaočkovány 500 ml varné baňky s 50 ml inokulačního média o složení: octan sodný 5 g, sacharosa 2 g, kukuřičný výluh (65 % hm. sušiny) 3 g, doplněno na 100 ml; pH po sterilaci 7,0–7,2.

Baňky byly kultivovány na rotační třepačce (240 ot/min, exc. = 25 mm) po dobu 24 h při teplotě 29 °C. Vyroslou kulturou, v množství 10 % obj., byly zaočkovány 500 ml varné baňky s 20 ml fermentačního média o složení: hydrolyzát dřeva (2,1 % hm. red. látek) 85 ml, hydrolyzát arašídové mouky 15 ml, kukuřičný výluh (65 % hm. v sušině) 1 g, octan sodný 2 g, síran amonný 1 g, hydrogenfosforečnan draselný 0,1 g, síran hořečnatý kryst. 0,01 g, uhličitán vápenatý 3 g; pH po sterilaci 7,0–7,2. Fermentační baňky byly kultivovány při 29 °C po dobu 72 h.

Tab. 2. Produkce L-lysinu u kmenů *Corynebacterium glutamicum* ve fermentačním médiu s hydrolyzátního dřeva a kyselinou octovou

Corynebacterium glutamicum kmen	Produkce L-lysinu (g/l media)		
	24 h	48 h	72 h
I.	10,8	17,8	21,5
II.	8,5	21,3	21,6
III.	10,1	20,5	24,6

Od 6 h fermentace, kdy pH kultury stoupl na 7,8 až 8,0, byla do fermentačního média dávkována směs A o složení: konc. hydrolyzát dřeva 85 ml, koncentrovaná kyselina octová 15 ml, octan amonný 1,8 g, sacharosa 6 g. Přídavkem této směsi do baňky bylo současně upra-

Tab. 3. Celkové množství dávkovaných monosacharidů hydrolyzáta dřeva a jejich utilizace do 72 h fermentace u kmenů I. a II.

Corynebacterium glutamicum kmen	Monosacharidy obsažené v hydrolyzáte dřeva (g/l)			Monosacharidy po 72 h kultivace (g/l)			L-lysin (g/l)
	GLU	MA	XY	GLU	MA	XY	
I.	24,8	5,4	101,1	0	1	4	22,2
II.	21,8	5,0	9,0	0	1	4	22,0

Poznámka: GLU = glukosa, MA = manosa, XY = xylosa

Tab. 4. Celkové množství uhlíkatých zdrojů pro biosyntézu L-lysinu u Corynebacterium glutamicum

Zdroj uhlíku	g/l média
Monosacharidy hydrolyzáta dřeva v médiu	25
Monosacharidy hydrolyzáta dřeva dávkované ve směsi	40
Octany v médiu	12
Octany dávkované ve směsi	33
Sacharosa dávkovaná ve směsi	10
Celkem zdrojů uhlíku	120 g/l

veno pH na hodnotu 6,9–7,2. Průběh biosyntézy L-lysinu je uveden v tabulce 2.

Hodnoty zbytkové koncentrace jednotlivých monosacharidů ve fermentačním médiu po 72 h kultivace ukazují na úplnou utilizaci glukosy a 80% spotřebu manosy. Xylosa je užívána ze 60 % u obou produkčních kmenů (tab. 3). Vzhledem k nízkým výchozím koncentracím galaktosy a rhamosy v hydrolyzáte dřeva nebyla jejich utilizace sledována. Množství sacharosy, které bylo obsaženo ve směsi, představuje zhruba 10 % veškerých zdrojů uhlíku. Množství uhlíkatých látek pro biosyntézu L-lysinu je uvedeno v tabulce 4.

2. Ověření fermentačního postupu biosyntézy L-lysinu v měřítku 21 laboratorních fermentačních tanků

Výsledky získané v baňkových pokusech byly ověřeny v měřítku 21 laboratorních fermentačních tanků. Jako produkční mikroorganismus byl vybrán kmen I. Složení inokulační a produkční půdy bylo stejné jako u baňkových pokusů.

Podmínky fermentace: objem média 600 ml, míchání 800 ot/min, vzdušnění 0,5–0,8 obj./min, teplota 29 °C, oděňování sójovým olejem.

Po 18 h kultivace, kdy pH kultury vzrostlo na hodnotu 7,8–8,0, začalo být v tříhodinových intervalech dávkováno do fermentoru 10 ml směsi A. Touto směsí se současně reguluje pH média na hodnotu 7,0–7,2. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Výsledky produkce L-lysinu ukazují na prakticky stejnou schopnost utilizace sacharidů přítomných v hydrolyzáte dřeva a kyseliny octové u různě geneticky determinovaných produkčních mikroorganismů.

Dosahovaná produkce L-lysinu (kolem 22 g/l média) u kmene I představuje 20% konversi aplikovaných uhlí-

Tab. 5. Průběh biosyntézy L-lysinu na bázi hydrolyzáta dřeva v měřítku 21 fermentačních tanků u Corynebacterium glutamicum, kmen I.

Kultivace (h)	Neutilizované redukující látky (g/l)	Amoniakální dusík (g/l)	Produkce L-lysinu (g/l)
24	3,8	5,2	5,4
48	4,5	4,1	16,4
72	4,0	3,1	20,1

katých zdrojů, tj. monosacharidů hydrolyzáta dřeva a kyseliny octové. K produkci stejného množství L-lysinu by klasický postup vyžadoval 10 % hm. sacharosy v médiu. Fermentační postup na netradičních zdrojích uhlíku umožňuje až 90% náhradu dosud používaných surovin.

Výsledky pokusů v měřítku laboratorních fermentačních tanků ukazují reálnou možnost převodu fermentačního postupu biosyntézy L-lysinu do měřítka poloprodučního. Výťažnost L-lysinu je přímo závislá na kvalitě hydrolyzáta dřeva, obsahu a zastoupení hexos a pentos a současně koncentraci vedlejších produktů hydrolýzy, které působí toxicky na mikroorganismy (furfural a jeho deriváty).

Současný intenzivní výzkum a dosažené výsledky v oblasti chemické hydrolýzy dřeva v Sovětském svazu a BLR dávají reálné předpoklady pro průmyslovou aplikaci hydrolyzáta při fermentační přípravě excesivních metabolitů u mikroorganismů.

Literatura

- [1] LINKO, M.: Adv. Biochem. Eng., vol. 5, 1977, s. 27
- [2] BEKER, M.: Adv. Microb. Eng., Part I, 4, 1973, s. 233
- [3] PEČULIS, J. P., Biotechnol. i bioinž. 2, Riga 1978
- [4] SHIMURA, Y., VOGEL, H. J.: Bioch. Biophys. Acta, 118, 1966, s. 396
- [5] Čs. patent. spis č. 118 188, 1966
- [6] BULANT V.: Sborník „Bílkoviny, jejich produkce a využití“, Praha 1985
- [7] JANÍČEK, G.: Rukověť potravinářské analitiky, Praha 1962
- [8] TOMÍČEK, O.: Kvantitativní analýza, Praha 1954
- [9] HANSEN, S. A. G.: J. Chromat., 107, 1975, s. 224
- [10] ZAJCEVA, Z. M.: Úspěchy mikrobiologie, 11, 1976, s. 157
- [11] SHIKO, I., SANO, K.: J. Gen. Appl. Microbiol., 15, 1971, s. 267
- [12] PELECHOVÁ, J., SMÉKAL, F., BULANT, V., KRUMPHANZL, V.: Kvasný průmysl, 25, 1979, s. 174
- [13] PELECHOVÁ, J., ŠRUMA, T., PLACHÝ, J., KRUMPHANZL, V.: Sborník VŠCHT, E 49, 1977, s. 145

Smékal F., Pelechová J., Kindlová E., Krumphanzl V.: Biosyntéza L-lysinu na bázi hydrolyzáta dřeva a kyseliny octové u kmenů Corynebacterium glutamicum. I. Utilizace uhlíkatých zdrojů. Kvas. prům., 26, 1980, č. 9, s. 200–202.

Hexoso-pentosový komplex sacharidů obsažený v kyselé hydrolyzáte dřeva je v kombinaci s kyselinou octovou vhodnou náhradou sacharosy ve fermentační půdě pro biosyntézu L-lysinu kmeny Corynebacterium glutamicum. Výsledky pokusů v měřítku laboratorních fermentačních tanků ukázaly reálnou možnost převodu fermentačního postupu biosyntézy L-lysinu do měřítka poloprodučního. Výťažnost L-lysinu je přímo závislá na kvalitě hydrolyzáta dřeva, obsahu a zastoupení jednotlivých hexos a pentos a současně na koncentraci vedlejších produktů hydrolýzy, které působí inhibičně na růst mikroorganismu.

Смекал, Ф. — Пелехова, Я. — Киндлова, Е. — Крмпханзл, В.: Биосинтез Л-лизина, вызываемый штаммами

бактерий *Corynebacterium glutamicum* в среде, состоящей из древесного гидролизата и уксусной кислоты. 1-ая часть. Использование запасов углеродистых веществ. Квас. прум., 26, 1980, № 9, стр. 200—202.

Гексозо-пентозовый комплекс сахаридов, находящийся в кислом древесном гидролизате, может — в комбинации с уксусной кислотой — заменить сахарозу в сбраживаемой среде, где в результате биосинтеза, вызываемого штаммами бактерий *Corynebacterium glutamicum* образуется Л-лизин. Результаты экспериментов, осуществленных в лабораторных бродильных чанах, показали реальную возможность проверить метод в более крупном масштабе, в опытной установке. Выход Л-лизина зависит от качества древесного гидролизата, содержание отдельных гексоз и пентоз, а также от концентрации побочных продуктов гидролиза, которые замедляют размножение микроорганизмов.

Smékal, F. - Pelechová, J. - Kindlová, E. - Krumphanzl, V.: Biosynthesis of L-lysine Produced by the *Corynebacterium glutamicum* Strains in Media Consisting of Wood Hydrolysate and Acetic Acid. Part I. Utilisation of Carbon Sources. Kvas. prům., 26, 1980, No. 9, pp. 200—202.

Hexose-pentose saccharid complex present in acid wood hydrolysate can — if combined with acetic acid — serve as a substitute for saccharose in fermentation media used for biosynthesis of L-lysine produced by the *Corynebacterium glutamicum* strains. Results of ex-

periments carried out in laboratory fermentation tanks show that the method, i. e. biosynthesis of L-lysine by fermentation processes is ripe and proven enough to be introduced in a suitable pilot plant. The yield of L-lysine depends on the quality of wood hydrolysate, proportion of individual hexoses and pentoses, as well as on the concentration of hydrolysis by-products which inhibit the propagation of microorganisms.

Smékal, F. - Pelechová, J. - Kindlová, E. - Krumphanzl, V.: Biosynthese des L-lysins auf Basis des Hydrolysats des Holzes und der Essigsäure bei den Stämmen *Corynebacterium glutamicum*. I. Ausnützung der Kohlenstoffquellen. Kvas. prům., 26, 1980, No. 9, S. 200—202.

Der Hexosen-Pentosen-Komplex der Saccharide, der in dem saueren Holzhydrolysat enthalten ist, stellt in Kombination mit der Essigsäure einen geeigneten Saccharoseersatz in dem Fermentationsboden für die Biosynthese des L-Lysins durch die Stämme *Corynebacterium glutamicum* dar. Die Ergebnisse der Versuche im Ausmaß von Laborfermentoren zeigten die reale Möglichkeit der Überführung des Fermentationsverfahrens der Biosynthese des L-Lysins in das halbbetriebliche Stadium. Die L-Lysin-Ausbeute ist direkt von der Qualität des Holzhydrolysats, dem Gehalt und der Vertretung der einzelnen Hexosen und Pentosen und zugleich von der Konzentration der Hydrolyse-Nebenprodukte abhängig, die auf das Wachstum der Mikroorganismen hemmend einwirken.