

# Speciální fermentační procesy

## Fermentační příprava aminokyselin z netradičních zdrojů uhlíku

063.15:547.466

Ing. JANA PELECHOVÁ, CSc., Vysoká škola chemicko-technologická, Praha  
RNDr. JIŘÍ PLACHÝ, CSc., RNDr. FRANTIŠEK SMĚKAL, CSc., Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

V posledních letech se v širokém měřítku zvýšil zájem o studium některých náhradních surovin, které by v oblasti fermentační mikrobiologie nahradily klasické zdroje uhlíku — sacharosu, melasu, škrob — jejichž množství je v současné době nedostatečné, a jejichž ceny se stále zvyšují.

Tendence nahradit tradiční zdroje uhlíku — především sacharidy — netradičními zdroji, která se projevila již v šedesátých letech ve výzkumu možností aplikace těchto substrátů pro přípravu bílkovin mikrobiálního původu, se odrazila i ve studiu přípravy aminokyselin fermentační cestou. Jako netradiční uhlíkaté zdroje byly zkoušeny uhlovodíky, alkoholy (methanol, ethanol) i kyseliny (kyselina octová), v poslední době pak také produkty hydrolýzy celulóзовých odpadů, zvláště dřeva. Předmětem tohoto sdělení je přehledná informace o využití těchto substrátů při fermentační přípravě aminokyselin. Předností mikrobiální syntézy aminokyselin je skutečnost, že oproti chemické přípravě jsou produkovány přímo biologicky aktivní L-isomery. Již začátkem šedesátých let upozornili japonští pracovníci (Yamada et al., 1962), na možnost produkce aminokyselin z uhlovodíků. V Japonsku byl prováděn

rozsáhlý výzkum využitelnosti uhlovodíků (především n-alkánů, ale též cykloparafinů, alkylaromátů a různých frakcí ropy) k fermentační přípravě aminokyselin, a to s použitím jak kmenů mikroorganismů izolovaných z přirozených materiálů, tak mutantů různých typů (auxotrofní mutanty a mutanty rezistentní k analogům aminokyselin). Z mikroorganismů se osvědčily bakterie a jejich mutanty, především druhy rodů *Corynebacterium* a *Arthrobacter*.

Tak při kultivaci kmene *Corynebacterium alkanolyticum* v médiu s n-parafíny jako zdroji uhlíku byla v médiu hromaděna kyselina glutamová v množství až 72 g/l (Nakao et al., 1970, 1972). Také kmen druhu *Arthrobacter paraffineus* produkoval kyselinu glutamovou (Suzuki et al., 1977). Výrazná produkce této aminokyseliny (až 84 g/l) byla zaznamenána s kmenem *Corynebacterium hydrocarboclastus* (Kobayashi et al., 1972). Kyselinu glutamovou hromadily v médiu s uhlovodíky také mutanty těchto rodů, např. mutanty vyžadující k růstu kyselinu olejovou (jap. pat., 1976).

Auxotrofní mutanty těchto bakteriálních rodů produkují v médiích s n-parafíny také jiné aminokyseliny. Mutanta druhu *Corynebacterium hydrocarboclastus* de-

pendentní na arginin hromadila v médiu ornithin (Uchio et al., 1967), mutanta druhu *Arthrobacter paraffineus*, vyžadující k stimulaci růstu isoleucin, produkovala threonin (brit. pat., 1970), a mutanty dependentní na tyrosin a nebo na fenylalanin byly producenty tyrosinu (franc. pat., 1969) a nebo fenylalaninu (Toroko et al., 1970). Mutanty dependentní na isoleucin hromadily v prostředí valin a leucin (Ishii et al., 1967). Producentem prolinu byla mutanta druhu *Corynebacterium acetacidophilum* vyžadující k růstu isoleucin. Z mutant rezistentních k analogům aminokyselin mutanta druhu *Nocardia gallica* rezistentní k  $\epsilon$ -(2-aminoethyl)-L-cysteinu v médiu s n-alkány tvořila a do prostředí uvolňovala lysin (jap. pat., 1977a).

Obtížné technického rázu při kultivaci bakterií asimilujících uhlovodíky, námitky hygieniků proti jejich aplikaci a v neposlední řadě i stoupající ceny ropy, to vše vedlo k tomu, že v současné době se dává přednost jiným zdrojům uhlíku než uhlovodíkům. Platí to především o methanolu, nicméně ani ethanol nebo kyselina octová nepřestávají být perspektivními surovinami pro fermentační přípravu aminokyselin.

### Methanol

Využití methanolu jako zdroje uhlíku při fermentační přípravě aminokyselin je věnována v současné době zvýšená pozornost výzkumných pracovníků, především v Japonsku, ale i v NSR. Svědčí o tom řada prací objevených se v posledních pěti letech.

Tvorbou aminokyselin (kyseliny glutamové, serinu) a vitamínů (flavinů, kobalamínu) kvasinkami asimilujícími methanol se zabývají ve svém přehledu západoněmečtí autoři (Sahm et al., 1977). O schopnosti kmene *Micrococcus evaneus* hromadit v médiu s methanolem jako zdrojem uhlíku aminokyseliny (valin, leucin, lysin, alanin, isoleucin, kyselina asparagová) pojednává japonský patent z roku 1977. Ogata et al. (1977), izolující z půdy kmeny mikroorganismů schopné asimilovat methanol, sledovali jejich schopnost produkovat a do prostředí uvolňovat aminokyseliny. Podařilo se jim izolovat kmen, který identifikovali jako *Methylomonas aminofaciens* a který hromadil v médiu valin, leucin a alanin. O produkci kyseliny glutamové kmeny rodů *Corynebacterium* a *Brevibacterium* v médiu s methanolem a penicilinem pojednává japonský patent z roku 1977 (1977c). Z methanol asimilujícího kmene *Methylomonas methanophila* byly izolovány — po indukci N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidinem — mutanty rezistentní k analogům aromatických aminokyselin a produkcí fenylalanin, tyrosin a tryptofan (Suzuki et al., 1977). Z dalších bakteriálních rodů schopných využívat methanol lze kromě rodu *Methylomonas* jmenovat ještě rod *Protaminobacter*, který stejně jako druh *Methylomonas methylovora* produkuje leucin (jap. pat., 1976c). Mutanty rodu *Protaminobacter* rezistentní k aminokyselinám (např. k threoninu) a jejich analogům hromadily v prostředí isoleucin (jap. pat., 1976a). Byla také popsána fermentační příprava serinu z glycinu bakteriemi schopnými asimilovat methanol (rod *Aeromonas*, *Achromobacter* a *Pseudomonas* — jap. pat., 1977b). Také kmen *Arthrobacter globiformis* a jeho mutanta vyžadující k růstu methionin v médiu s methanolem a glycinem hromadil relativně vysoká množství serinu (5 g/l) (Tani et al., 1978).

Zatímco využití methanolu pro přípravu aminokyselin fermentační cestou je záležitostí poměrně nedávnou, byly dvouuhlíkaté substráty jako je ethanol nebo kyselina octová předmětem základního výzkumu a praktického využití při fermentační přípravě aminokyselin již v letech šedesátých, jak o tom svědčí některé práce uvedené dále.

### Dvouuhlíkaté sloučeniny (ethanol, kyselina octová)

Základním výzkumem asimilace  $C_2$ -sloučenin (ethanol, kyselina octová) mikroorganismy se zabývala skupina profesora Kornberga, které se podařilo v průběhu desetileté intenzivní práce objasnit mechanismus asimilace i způsob regulace tohoto mechanismu. Tak již v roce 1957 bylo zjištěno (Kornberg a Krebs, 1957), že mnohé mikroorganismy využívají jako jediný zdroj uhlíku  $C_2$ -sloučeniny, a to díky tomu, že jsou vybaveny tzv. glyoxalátovým cyklem, představujícím zkrácenou analogii Krebsova cyklu, v němž isocitrát je enzymaticky rozštěpen na sukcinát a glyoxalát, který kondenzuje s koenzymem A na malát, tj.  $C_4$ -sloučeninu. V médiích s ethanolem nebo kyselinou octovou jsou čtyřuhlíkaté sloučeniny, které vznikly v glyoxalátovém cyklu, využívány při biosyntéze uhlíkatého skeletu molekul aminokyselin (Kornberg, 1958). V metabolismu je acetylát přeměňován na acetyl-koenzym A, který může reagovat jako s oxalacetátem na citrát, jako je tomu v Krebsově cyklu, tak s glyoxalátem na malát v cyklu glyoxalátovém. Obě tyto kondenzační reakce jsou katalyzovány dvěma různými enzymy (Kornberg a Madsen, 1958). Klíčovým enzymem glyoxalátového cyklu je isocitrátlyáza, katalyzující aldolové rozštěpení isocitrátu na sukcinát a glyoxalát. U mikroorganismů rostoucích v médiu s acetaem nebo s látkami metabolizovanými na acetylát byla zjištěna inducibilní povaha tohoto enzymu (Kornberg, 1963). Kontrola glyoxalátového cyklu se uskutečňuje prostřednictvím vnitrobuněčných koncentrací fosfoenolpyruvátu, ovlivňujícího nejen tvorbu, ale i aktivitu isocitrátlyázy (Ashworth a Kornberg, 1963). Fosfoenolpyruvát je v represivním účinku rušen přítomností acetylátu. Indukční účinek acetylátu lze spíše než za přímou indukci považovat za důsledek odstranění vnitrobuněčného represoru, který se váže s acetaem nebo s jeho aktivní formou, tj. s acetyl-koenzymem A (Kornberg et al., 1964).

Shrnuje tedy výsledky výzkumu asimilace  $C_2$ -sloučenin mikroorganismy, konstatuje Kornberg (1966), že růst mikroorganismů na jakémkoliv zdroji uhlíku je nezbytně doprovázen nepřetržitým úbytkem intermediátů tvořených v Krebsově cyklu. Především to platí o oxalacetátu, z něhož se tvoří kyselina asparagová a z té lysin, methionin, threonin nebo isoleucin bílkovin stejně jako pyrimidinů nukleových kyselin. Má-li cyklus fungovat, musí být oxalacetát nebo jeho prekurzory dodány z média. Roste-li organismus v médiu obsahujícím sloučeniny, které nejsou metabolizovány na intermediáty cyklu, musí se uskutečnit „doplnění“ cyklu, tzv. anapleurotickou sekvencí, což je enzymatická sekvence sloužící jako mechanismus dodávající nezbytné intermediáty (Kornberg, 1965). Tato anapleurotická sekvence se uplatňuje při růstu organismu na acetau, a to ve formě tzv. glyoxalátového cyklu, regulovaného syntézou a aktivitou isocitrátlyázy prostřednictvím vnitrobuněčných koncentrací fosfoenolpyruvátu, který jako konečný produkt glyoxalátového cyklu reguluje celý cyklus negativní zpětnou vazbou.

Při sledování růstu kmene druhu *Saccharomyces cerevisiae* na ethanolu jako jediném zdroji uhlíku bylo zjištěno, že ethanol je metabolizován uvedeným glyoxalátovým cyklem, a to tak, že ethanol je oxidován přes acetaldehyd na kyselinu octovou a ta v aktivní formě acetyl-koenzymu A, se zapojuje do glyoxalátového cyklu (Mor a Fiechter, 1968). Prostřednictvím tohoto cyklu je využíván ethanol i kyselina octová mikroorganismy při biosyntéze aminokyselin.

### Ethanol

Většina prací zabývajících se využitím ethanolu jako zdroje uhlíku se týká fermentační přípravy kyseliny glutamové a lysinu. Několik prací je však věnováno fer-



mentační přípravě i jiných aminokyselin — jako např. threoninu s použitím mutanty *Brevibacterium flavum* rezistentní ke kyselině  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxyvalerové (*brit. pat.*, 1972) nebo prolinu, produkovaného mutantou *Corynebacterium acetoacidophilum* rezistentní k thiazolalaninu (*U.S. pat.*, 1974) nebo posléze serinu, připraveného fermentační cestou z glycinu v médiu s ethanolom jako zdrojem uhlíku (*jap. pat.*, 1977e).

Problematické tvorby kyseliny glutamové z ethanolu je věnována práce japonských autorů (*Okai et al.*, 1968), kteří při výběru kmenů asimilujících ethanol a hromadících v médiu kyselinu glutamovou vybrali jako nejvhodnější kmen *Brevibacterium* sp. B 136, hromadící až 53 g/l kyseliny glutamové v médiu po 60–72 h kultivace. Jiný, blíže neurčený kmen rodu *Brevibacterium*, produkoval v médiu s ethanolom až 60 g/l kyseliny glutamové (*Kanzaki et al.*, 1972). Kmen *Corynebacterium glutamicum* v médiu s ethanolom a propanolem, které byly jako směs přidávány do média během kultivace, v přítomnosti penicilinu produkoval a do média uvolňoval kyselinu glutamovou (*jap. pat.*, 1978a). Při ověřování možnosti náhrady sacharosy (*Pelechová et al.*, 1977) ethanolom s použitím mutanty *Corynebacterium glutamicum* dependentní na homoserin bylo zjištěno, že se zvyšující koncentrací ethanolu produkce lysinu klesá za současného zvyšování nárůstu biomasy. Pouze 25 % cukru v médiu lze nahradit bez snížení produkce. Při náhradě většího množství je cukr využíván patrně jako zdroj uhlíku a energie pro tvorbu biomasy. Při postupné náhradě sacharidického uhlíku ethanolickým nebyly zaznamenány změny ve složení a kvantitativním zastoupení aminokyselin v hydrolyzátech buněk produkčního kmene, což je významné zjištění z hlediska využití lysinu, připraveného s použitím netradičních uhlíkatých zdrojů, pro krmné účely (*Pelechová et al.*, 1979). Byla sledována také produkce lysinu u auxotrofních a auxotrofních a současně rezistentních mutant rodu *Corynebacterium* v médiích se sacharosou, ethanolom, kyselinou octovou a směsí octové kyseliny a octanu sodného nebo amonného. Bylo zjištěno, že nejlepší náhradou sacharosy je směs kyseliny octové a octanu amonného (*Pelechová et al.*, 1980). Produkci lysinu kmenem *Brevibacterium flavum* ATCC 21127 v médiu s glukosou, sacharosou, ethanolom nebo kyselinou octovou sledovala *Kopecká* (1975) a zjistila, že nejvhodnějším zdrojem uhlíku pro produkci lysinu u tohoto kmene je sacharosa. Vlivem ethanolu na růst kmenů rodu *Corynebacterium* a *Brevibacterium* a jejich schopností produkovat lysin v médiích kompletních a syntetických se zabývala *Zajceva* se spolupracovníky (1978). Problematickou fermentační přípravu lysinu z ethanolu se zabývá také řada patentů. S mutantami druhů *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Bacillus megatherium* a *Arthrobacter paraffineus* bylo v médiu, kde hlavním zdrojem uhlíku byl ethanol, který byl přidáván na počátku kultivace nebo v jejím průběhu v celkovém množ. 10–200 g/l, dosaženo produkci 2,3–5,6 g/l (*švýc. pat.*, 1970). V médiu se samotným ethanolom jako zdrojem uhlíku bylo dosaženo výše uvedenými bakteriálními druhy produkci 2,3–8,4 g/l lysinu (*brit. pat.*, 1970a). Mutanty rodu *Nocardia* při dávkování ethanolu do 1 % dosáhly produkce 12 g/l lysinu a při dávkování směsi parafinů a ethanolu až 16,5 g/l lysinu, přičemž hlavním zdrojem uhlíku jsou uhlovodíky, které lze nahradit ethanolom jen z 50 % (*franc. pat.*, 1970; *brit. pat.*, 1971; *švýc. pat.*, 1974). S použitím mutanty *Arthrobacter alcanicus* ATCC 21657 byl patentován postup fermentační přípravy lysinu a isoleucinu (*NSR pat.*, 1972a). Jako zdroje uhlíku byly použity v tomto patentu uhlovodíky, alkoholy a mastné kyseliny. V médiu s ethanolom, dávkovaným po částech v celkové koncentraci 50 g/l, byly

zaznamenány produkce 6,0 g/l lysinu a 2,1 g/l isoleucinu. Západoněmecký patent firmy Ajinomoto (1973) popisuje přípravu lysinu s kmeny druhů *Brevibacterium lactofermentum*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium lilium* a *Corynebacterium acetoacidophilum* v médiu, kde jako zdroj uhlíku byly použity sacharidy, kyselina octová a ethanol. Byla-li do média přidávána iniciální směs glukosy + ethanolu a během kultivace byl dávkován samotný ethanol, bylo dosaženo po 48 h kultivace produkce 66 g/l lysinu. Mutanta druhu *Corynebacterium glutamicum* dependentní na homoserin, kultivovaná v médiu s ethanolom a propanolem přidávaných během kultivace, hromadila v médiu také lysin (*jap. pat.*, 1978).

#### Kyselina octová

Stejně jako v případě ethanolu, tak i u tohoto substrátu se většina prací týká fermentační přípravy buď kyseliny glutamové, nebo lysinu a relativně málo prací se zabývá aplikací kyseliny octové jako zdroje uhlíku při přípravě jiných aminokyselin. Tak v r. 1970 popisuje *Shiio* přípravu threoninu s mutantou druhu *Brevibacterium flavum* dependentní na methionin a rezistentní k  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxyvalerové kyselině, kultivovanou v médiu s acetátovými ionty. Na tomto substrátu produkovala mutanta *Brevibacterium flavum* rezistentní jen k  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxyvalerové kyselině isoleucin (*franc. pat.*, 1971). Tuto aminokyselinu produkovala také mutanta *Brevibacterium flavum* rezistentní k methioninu (*Ikeda et al.*, 1976). Při tom bylo zjištěno, že výši produkce významně ovlivňují koncentrace acetátových iontů a in'enzita vzdušnění (*Ikeda et al.*, 1976a).

Problematickou využití kyseliny octové jako zdroje uhlíku při fermentační přípravě kyseliny glutamové se zabývali jako první pracovníci japonské firmy Ajinomoto, kteří z různých kmenů rodu *Brevibacterium* a *Corynebacterium* schopných růst a hromadit značná množství kyseliny glutamové v médiu s acetátovými ionty vybrali jako nejvhodnější kmen *Brevibacterium flavum* 2247 (*Shiio et al.*, *Tsunoda et al.*, 1961, 1961a). Tento kmen rostl v chemicky definovaném médiu s acetátem jako zdrojem uhlíku a v médiu hromadil kyselinu glutamovou. Bylo zjištěno, že vliv biotinu na růst a produkci v acetátovém médiu patrně není tak výrazný jako je tomu v médiu glukosovém. Klidové buňky výše uvedeného kmene tvořily za aerobních podmínek v přítomnosti amonných iontů z acetátu glutamát, jak bylo zjištěno se značeným  $^{14}\text{CO}_2$  (*Shiio a Tsunoda*, 1961, 1961a). Bezbuněčné extrakty tohoto kmene katalyzují tvorbu acetyl-koenzymu A z acetátu. Tento acetyl-koenzym A reaguje s oxalocetovou kyselinou na citrát a s kyselinou glyoxalovou na malát. Při sledování aktivity isocitratázy kmene *Brevibacterium flavum* 2247 kultivovaného v acetátovém médiu bylo zjištěno (*Shiio et al.*, 1961), že isocitratáza je u tohoto organismu konstitutivním enzymem, jehož aktivita je v buňkách rostoucích v glukosovém médiu potlačována; v acetátovém médiu tato represe zaznamenána nebyla. Výsledky pokusů s klidovými buňkami inkubovanými se značeným acetátem ukázaly, že na vzniku glutamátu se podílí jak cyklus trikarboxylových kyselin, tak glyoxalátový cyklus (*Shiio a Tsunoda*, 1961a). Při akumulaci kyseliny glutamové tvořené z kyseliny octové se uplatňuje jako důležitý faktor patrně také transport kyseliny glutamové membránou, jak zjistili ve své práci *Kitano et al.* (1972). Zatímco kmen *Brevibacterium flavum* v acetátovém médiu kyselinu glutamovou tvořil, nebyla produkce této aminokyseliny zaznamenána v glukosovém médiu s biotinem (*jap. pat.*, 1976b). Bylo zjištěno, že *Micrococcus glutamicus* tvořil kyselinu glutamovou v acetátovém médiu jen v přítomnosti biotinu (*Kimura*, 1964). *Harada et al.* (1968) izolovali z půdy kmen, který identifikovali

jako druh *Corynebacterium acetophilum* nov sp., který je schopen v médiu s 10 % hm. acetátu jako jediným zdrojem uhlíku růst a hromadit kyselinu glutamovou. Tento organismus může růst i v nepřítomnosti biotinu, nicméně biotin zkracuje dobu nezbytnou k dosažení maximálního nárůstu. Produkce kyseliny glutamové byla stimulována přidáním kvasničného extraktu nebo kukuřičného výluhu do média jako zdroj biotinu. Stimulační účinek měl také penicilin přidáný ve vhodné době do média.

Působením N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidinu na buněčnou suspenzi kmene *Corynebacterium acetophilum* byly indukovány mutanty dependentní na homoserin a produkující lysin (Seto a Harada 1969) a byly zjišťovány optimální podmínky pro tvorbu lysinu z kyseliny octové. O vlivu aerace a koncentrace růstových faktorů na produkci lysinu kmenem *Micrococcus glutamicus* kultivovaným v acetátovém médiu píše Bachna et al. (1977). Mutanta rodu *Brevibacterium* submersně kultivovaná v glukosovém médiu, doplněném kyselinou octovou, produkovala relativně vysoká množství lysinu (34 g/l — Sakse et al., 1976).

Problematické fermentační přípravy lysinu z kyseliny octové je věnováno také několik patentů, jejichž autory jsou většinou japonští pracovníci. Tak francouzský patent firmy Ajimoto (1970a) popisuje přípravu lysinu s použitím kmenů druhů *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Corynebacterium acetophilum* a *Micrococcus glutamicus* v médiu, které bylo během kultivace obohacováno acetátovými ionty, a to tak, aby koncentrace substrátu nepřevýšila 1,5 %. Produkci stimulovalo přidání glukosy, melasy nebo hydrolyzátu škrobu během kultivace. Auxotrofní mutanta *Corynebacterium acetophilum* dependentní na homoserin hromadila 26 g/l lysinu (brit. pat., 1972a). Západoněmecký patent firmy Ajinomoto (1972) popisuje aplikaci kyseliny octové jako zdroje uhlíku při fermentační přípravě lysinu s použitím mutant druhů *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Corynebacterium acetophilum* a *Micrococcus glutamicus*. Při dávkování směsi kyseliny octové a octanu amonného v optimálním molárním poměru bylo dosaženo produkce lysinu převyšující hodnotu 60 g/l. Další zvýšení produkce lze dosáhnout současným dávkováním glukosy, melasy nebo hydrolyzátu škrobu. V tomto případě bylo dosaženo produkce 92,5 g/l. Sovětský patent této firmy udává jako optimum molární směsi kyseliny octové a octanu amonného poměr 1:0,1–0,5; při vyšším nebo nižším obsahu octanu se snižovala produkce lysinu. Produkce lysinu byla zaznamenána také v médiu s octanem amonným a chloridem sodným zaočkovaným mutantou *Corynebacterium acetophilum* dependentní na homoserin (jap. pat., 1977d). Vysoké produkce lysinu byly zaznamenány v médiích s glukosou a octanem amonným, zaočkovaným mutantami rodů *Brevibacterium* a *Corynebacterium* rezistentními k  $\epsilon$ -(2-aminoethyl)-L-cysteinu a citlivými k sloučeninám s chinonovým nebo chinolinovým skeletem (jap. pat., 1978b, 1978d). Mutanta druhu *Brevibacterium lactofermentum* rezistentní k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu v glukosovém médiu s kyselinou octovou hromadila 86 g/l lysinu (jap. pat., 1978c).

#### Hydrolyzáty lignoceluloseových odpadů

V souvislosti se stále se zvyšujícími cenami ropy a tím i petrochemických produktů obrací se pozornost na možnost využití hydrolyzátní různých lignoceluloseových odpadů jako potenciálních zdrojů uhlíku. Jedná se zvláště o hydrolyzáty dřeva, které se osvědčily při produkci krmných bílkovin. V současné době se prověřují a zdokonalují dosavadní technologie hydrolyzy lignoceluloseových materiálů, zvláště ve státech, které mají velko-

kapacitní závody na zpracování odpadního dřeva, jako SSSR a BLR.

V oblasti technologie hydrolyzy se v současné době dává přednost kyselé hydrolyze koncentrovanými minerálními kyselinami před hydrolyzou alkalickou a enzymatickou. Hydrolyzou polysacharidů rostlinných tkání vzniká směs různých sacharidů, jejichž zastoupení je závislé na použité výchozí surovině. K lehce hydrolyzovatelným polysacharidům patří hemicelulosa (mannan, glukany a xylany), k těžce hydrolyzovatelným pak celulóza. Souběžně s probíhající hydrolyzou polysacharidů probíhá však rozklad vznikajících monosacharidů. Z pentos vzniká relativně stálý 2-furankarbaldehyd, z hexos málo stálý 5-hydroxymethyl-2-furankarbaldehyd, který se rychle rozkládá na kyselinu levulovu, mravenčí a huminové látky. Spolu ještě s dalšími degradačními produkty působí tyto látky jako inhibitory růstu mikroorganismů a jejich produkce mimobuněčných metabolitů (Linko, 1977).

V hydrolyzátech, připravených perkolační kyselou hydrolyzou převážně jehličnatého odpadního dřeva, byly kapalinovcovo chromatografií zjištěny tyto monosacharidy: glukosa, manosa, galaktosa, xylosa, arabinosa a rhamnosa (Pelechová, 1979).

Kromě dřeva je možno hydrolyzovat také odpady dřevozpracujícího průmyslu, dále lnu a rašeliny. V hydrolyzátech lněného odpadu nebyla prokázána galaktosa a rhamnosa, relativně vysoký byl obsah manosy (50 % hm.) a xylosy (30 % hm.). V hydrolyzátech rašeliny byla zjištěna glukosa, xylosa, galaktosa, manosa, rhamnosa a arabinosa (Peculis, 1978).

Hydrolyzát rašeliny byl použit při fermentační přípravě aminokyselin, jak o tom svědčí sovětský patent (1975) o přípravě lysinu. Jako produkční kmen byla použita mutanta *Brevibacterium* sp. 22L. Inokulační médiem obsahovalo hydrolyzát rašeliny s obsahem 3–4 % hm. redukujících látek, jako zdroje dusíku bylo užito kukuřičného výluhu a amonné soli. Pro vlastní fermentaci lysinu se používá ředěný hydrolyzát rašeliny obsahující 7–8 % hm. redukujících látek, doplněný kukuřičným výluhem, anorganickými solemi a dalšími růstovými faktory. Fermentace probíhá za standardních podmínek vzdušnění, míchání a kultivační teploty. Doplnění produkčního média melasou na 7 % hm. redukujících látek v průběhu kultivace umožňuje dosažení produkce 16–25 g/l půdy lysinu za 67–72 hodin. Při aplikaci celkového množství 30 % hm. melasy se dosahuje výtěžku až 30 g/l půdy lysinu za stejnou dobu kultivace. V průběhu fermentace se přednostně využívají monosacharidy a disacharidy. Zbytková hodnota neasimilovatelných redukujících látek na konci kultivace je 0,7 až 1 % hm.

#### Literatura

- [1] ASHWORTH, J. K., KORNBERG, H. L.: Biochim. Biophys. Acta **73**, 1963, s. 519
- [2] BACHNA, T. A., ANTIPOV, V. P., MARKIZOVA, L. N., SOKOLOV, A. K., FRANK-KAMENECKAJA, M. D.: Chim. farm. Ž. **12**, 1977, s. 69
- [3] HARADA, T., SETO, K., MUROOKA, Y.: J. Ferment. Technol. **46**, 1968, s. 169
- [4] IKEDA, S., FUJITA, I., HIROSE, Y.: Agr. Biol. Chem. **40**, 1976, s. 511
- [5] IKEDA, S., FUJITA, I., HIROSE, Y.: Agr. Biol. Chem. **40**, 1976a, s. 517
- [6] ISHII, R., OTSUKA, S., SHIHO, I.: J. Gen. Appl. Microbiol. **13**, 1967, s. 217
- [7] KANZAKI, T., KITANO, K., KUMANO, Y., OKAZAKI, N.: J. Agr. Chem. Soc. Japan, **46**, 1972, s. 95
- [8] KIMURA, K.: J. Gen. Appl. Microbiol. **10**, 1964, s. 23
- [9] KITANO, K., SUGIYAMA, Y., KANZAKI, T.: J. Ferment. Technol. **50**, 1972, s. 182
- [10] KOBAYASHI, K., IKEDA, S., HISHINUMA, K., HIROSE, Y., OKADA, H.: Agr. Biol. Chem. **36**, 1972, s. 961
- [11] KOPECKÁ, M.: Diplomová práce VŠCHT, Praha, 1975
- [12] KORNBERG, H. L., KREBS, H. A.: Nature **179**, 1957, s. 988
- [13] KORNBERG, H. L.: Biochem. J. **68**, 1958, s. 535
- [14] KORNBERG, H. L., MADSEN, N. B.: Biochem. J. **68**, 1958, s. 549
- [15] KORNBERG, H. L.: Biochim. Biophys. Acta **73**, 1963, s. 517
- [16] KORNBERG, H. L., DENNIS, J., WILSON, E. M.: Biochem. J. **92**, 1964, s. 55



- [17] KORNBERG, H. L.: *Angew. Chemie* **77**, 1965, s. 601  
 [18] KORNBERG, H. L.: *Biochem. J.* **99**, 1966, s. 1  
 [19] LINKO, M.: *J. Adv. Biochem. Eng.* **5**, 1977, s. 27  
 [20] MOR, J. R., FIECHTER, A.: *Biotech. Bioeng.* **10**, 1968, s. 159  
 [21] NAKAO, Y., KIKUCHI, M., SUZUKI, M., DOI, M.: *Agr. Biol. Chem.* **34**, 1970, s. 1875  
 [22] NAKAO, Y., KIKUCHI, M., SUZUKI, M., DOI, M.: *Agr. Biol. Chem.* **36**, 1972, s. 490, 809  
 [23] OGATA, K., IZUMI, Y., KAWAMORI, M., ASANO, Y., TANI, Y.: *J. Ferm. Technol.* **55**, 1977, s. 444  
 [24] OKI, T., SAYAMA, Y., NISHIMURA, Y., OZAKI, A.: *Agr. Biol. Chem.* **32**, 1968, s. 119  
 [25] PEČULIS, J. P.: *Biotehnologija i bioinženierija*, Zinatne, Rīga, 1978  
 [26] PELECHOVÁ, J., ŠRUMA, T., PLACHÝ, J., KRUMPHANZL, V.: *Sborník VŠCHT v Praze E 49 Potraviný* 1977, s. 145  
 [27] PELECHOVÁ, J., KRUMPHANZL, V., KADLEC, K., STANĚK, J., SOKOLOV, T.: *Kvasný průmysl* **25**, 1979, s. 58  
 [28] PELECHOVÁ, J., PÍCHA, P., PLACHÝ, J., BULANT, V., KRUMPHANZL, V.: *Sborník VŠCHT v Praze E 50 Potraviný* 1979, s. 147  
 [29] PELECHOVÁ, J., SMĚKAL, F., KOURA, V., PLACHÝ, J., KRUMPHANZL, V.: *Folia Microbiol.* **25**, 1980, s. 341  
 [30] SAHM, H., EGGELE, L., BEHRENDT, U., KEUNE, H., WAGNER, F.: *Dechema-monograf.* **81**, 1977, s. 187  
 [31] SAKSE, A., JEREMEJEVA, S. K., HALMANS, R.: *Mikrobiol. prep.*, Zinatne, Rīga, 1976  
 [32] SETO, K., HARADA, T.: *J. Ferment. Technol.* **47**, 1969, s. 558  
 [33] SHIO, I., MITSUGI, K., TSUNODA, T.: *J. Biochem.* **46**, 1959, s. 1665  
 [34] SHIO, I., OTSUKA, S. I., TAKAHASHI, M.: *J. Biochem.* **49**, 1961, s. 262  
 [35] SHIO, I., TSUNODA, T.: *J. Biochem.* **49**, 1961, s. 141  
 [36] SHIO, I., TSUNODA, T.: *J. Biochem.* **49**, 1961a, s. 148  
 [37] SHIO, I.: *Agr. Biol. Chem.* **34**, 1970, s. 488  
 [38] SUZUKI, M., BERGLUND, A., UNDEN, A., HEDEN, C. D.: *J. Ferment. Tech.* **55**, 1977, s. 466  
 [39] TANI, Y., KANAGAWA, T., HANPONGKITTIKUN, A., OGATA, K., YAMADA, H.: *Agr. Biol. Chem.* **42**, 1978, s. 2271  
 [40] TOKORO, Y.: *Agr. Biol. Chem.* **34**, 1970, s. 1516  
 [41] TSUNODA, T., SHIO, I., MITSUGI, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **7**, 1961, s. 18  
 [42] TSUNODA, T., SHIO, I., MITSUGI, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **7**, 1961, s. 18  
 [43] TSUNODA, T., SHIO, I., MITSUGI, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **7**, 1961a, s. 30  
 [44] UCHIO, R.: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**, 1967, s. 303  
 [45] YAMADA, K., TAKAHASHI, I., KOBAYASHI, K.: *Agr. Biol. Chem.* **26**, 1962, s. 636  
 [46] ZAJCEVA, Z. M., KOZYREV, A. L. F., KUZNECOVA, N. N., ŠILNIKOVA, I. I.: *Prikl. Biochim. Mikrobiol.* **14**, 1978, s. 196  
 [47] Brit. pat. 1,190,546, 1970  
 1,200,587, 1970a  
 1,241,901, 1971  
 1,286,208, 1972  
 1,300,654, 1972a  
 [48] Franc. pat. 2,005,071, 1969  
 2,021,688, 1970  
 2,033,119, 1970a  
 [49] Jap. pat. 7638,793, 1976; C. A. 86:137976f, 1977  
 7691,931, 1976a; C. A. 85:190731q, 1976  
 7695,185, 1976b; C. A. 86:15235e, 1977  
 76,101,192, 1976c; C. A. 86:15241d, 1977  
 7718,886, 1977; C. A. 86:187668q, 1977  
 7751,09, 1977; C. A. 87:66610a, 1977  
 7782,786, 1977b; C. A. 87:166009a, 1977  
 7782,787, 1977c; C. A. 87:166008e, 1977  
 77,102,497, 1977d; C. A. 87:199169m, 1977  
 77,130,985, 1977e; C. A. 88:72991p, 1978  
 7820,490, 1978; C. A. 89:4584d, 1978  
 7841,492, 1978a; C. A. 89:40671d, 1978  
 7886,089, 1978b; C. A. 89:178091f, 1978  
 7886,090, 1978c; C. A. 89:195404a, 1978  
 7886,091, 1978d; C. A. 89:195403b, 1978

- [50] Sov. pat. 448,848, 1974  
 496,300, 1978  
 [51] Švýc. pat. 492,783, 1970  
 544,810, 1974  
 [52] U. S. pat. 3,818,483, 1974  
 [53] NSR pat. 2,100,159, 1972  
 2,136,317, 1972a  
 2,321,461, 1973

**Pelechová, J. - Plachý, J. - Směkal, F.: Fermentační příprava aminokyselin z netradičních zdrojů uhlíku.** *Kvas. prům.* **27**, 1981, č. 3, s. 64—68.

Autoři řešeršně zpracovali dostupné literární a patentové publikace zabývající se mikrobiální produkcí aminokyselin z netradičních zdrojů uhlíku, zvláště z metanolu, ethanolu, kyseliny octové a hydrolyzátů některých lignocelulózových materiálů.

**Пелехова, Я. - Плахи, Ю. - Сماعيل, Ф.: Производство аминокислот методом сбраживания с использованием в качестве источника углерода нетрадиционных исходных материалов.** *Квас. прум.* **27**, 1981, № 3, стр. 64—68.

V статье дается обзор патентов и литературы, посвященных проблематике применения микроорганизмов для производства сбраживанием аминокислот с использованием в качестве источника углерода разных нетрадиционных материалов, в том числе метанола, этанола, уксусной кислоты и гидролизатов некоторых видов лигноцеллюлозы.

**Pelechová, J. - Plachý, J. - Směkal, F.: Amino Acids Produced by Fermentation Processes from Unconventional Carbon Sources.** *Kvas. prům.* **27**, 1981, No. 3, pp. 64—68.

The authors present in the article all information so far published in patents and available literature dealing with the production of amino acids by fermentation from unconventional sources of carbon, as e. g. methanol, ethanol, acetic acid and hydrolysates of some lignocellulose materials.

**Pelechová, J. - Plachý, J. - Směkal, F.: Fermentative Produktion der Aminosäuren aus nichttraditionellen Kohlenstoffquellen.** *Kvas. prům.* **27**, 1981, No. 3, S. 64—68.

Die Autoren berichten über die Ergebnisse der Recherche aus der zugänglichen Zeitschrift- und Patentliteratur, welche die mikrobielle Produktion von Aminosäuren aus nichttraditionellen Kohlenstoffquellen behandelt, insb. aus Methanol, Äthanol, Essigsäure und Hydrolysaten einiger Lignocellulose-Materialien.