

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

II. Dvoufázová fermentace

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

Ing. JANA PELECHOVÁ, Vysoká škola chemickotechnologická, Praha

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

Nedostatek bílkovin jako základní složky potravy pro člověka vyžaduje nutnost vyrovnat tento deficit výrobou mikrobiálních bílkovin a aminokyselin. Jejich příprava fermentačními technologiemi je nepoměrně kratší ve srovnání se zemědělskou produkcí bílkovin. Mimořádný význam je kladen na esenciální aminokyseliny, např. L-treonin, L-tryptofan nebo L-lysin, který se současně významně uplatňuje jako doplněk krmiva pro výživu hospodářských zvířat. Fermentační výroba aminokyselin produkčními mikroorganismy vyžaduje značné množství uhlíkatých zdrojů, které jsou opět vázány na zemědělskou výrobu (sacharosa, melasa, dusíkaté substráty). Vzhledem k limitovanému množství a zvyšujícím se cenám klasických zdrojů uhlíku pro fermentační technologie je v současné době významné studium aplikace náhradních zdrojů uhlíku. To mohou být jednak produkty chemického průmyslu (syntetické látky jako kyselina octová, etanol, glykoly apod.) nebo chemicky zpracované přírodní materiály, např. hydrolyzáty dřeva, rašeliny, celulosových odpadů apod.

Využití hydrolyzátu dřeva jako náhradní uhlíkaté suroviny za sacharosu nebo melasu je dosud omezeno vzhledem k nízkému obsahu asimilovatelných sacharidů. Koncentrací hydrolyzátu se sice zvyšuje množství cukerných složek, ale současně se zvyšuje koncentrace toxických látek, působících inhibičně na růst mikroorganismů. Kyselou hydrolyzou se vzniklé monosacharidy degradují za vzniku určité koncentrace furfuralu a hydroxymetylfurfuralu, který je dále rozkládán na kyselinu levulovou a dále na mravenčí kyselinu. Na základě těchto poznatků jsme sledovali postup aplikace koncentrovaných hydrolyzáatů dřeva spolu s kyselinou octovou na produkční kulturu kmene *Corynebacterium glutamicum* po ukončení růstové fáze. V pokusech byla použita mutanta *Corynebacterium glutamicum* 7/11, vyžadující k růstu homoserin a která je současně rezistentní vůči S-aminoethylcysteinu. Kultivace produkčního kmeně probíhala v iniciační fázi fermentace na médiu s limitovanou koncentrací sacharosy nebo melasy a po ukončení růstové fáze (18 až 24 hodin kultivace) byla do média dávkována směs koncentrovaného hydrolyzátu dřeva, kyseliny octové a amoniaku jako zdroje dusíku. Tento dvoufázový typ fermentace byl ověřován v laboratorním měřítku a dále ve dvoulitrových fermentačních tancích.

MATERIÁL A METODY

V pokusech byla používána mutanta produkčního kmeně *Corynebacterium glutamicum* 7/11 ze sbírky mikroorganismů VÚAB. Kmen se udržuje pasážováním na maso-peptonových agarrech. Složení inokulačního média: 500 ml varné baňky se plní 50 ml inokulačního média tohoto složení: sacharosa techn. 2 g, octan sodný krystalický 1,5 g, kukuřičný výluh (60% hm. sušiny) 3 g, voda destilovaná ad 100 ml; pH média se upravuje na 7,0. Inokulační materiál: po zaočkování se baňky kultivují na rotační třepačce (240 ot.min.⁻¹) při teplotě 29 °C po dobu 18–24 hodin. Vyrostele kultury se v množství 10% obj. zaočkují 500 ml varné baňky, které obsahují 20 ml fermentačního média tohoto složení: sacharosa techn. 100 g, hydrolyzát arašídové mouky 20 ml, kukuřičný výluh (60% hm. sušiny) 1 g, síran amonný krystalický 1 g, hydrogenfosforenan draselný 0,1 g, síran hořečnatý krystalický 0,01 g, uhlíčan vápenatý mletý 3 g, voda destilovaná ad 100 ml; pH média po sterilaci 7,0. V případě pokusů s melasou byly použity koncentrace 10% obj. ve fermentačním médiu. Od

Tabulka 1. Obsah jednotlivých sacharidů v koncentrovaném hydrolyzátu dřeva (% hm.)

Glukosa	7,2
Xylosa	3,0
Mannosa	2,0
Maltosa	0,2
Arabinosa	0,1
Rhamnosa	0,05

24. hodiny kultivace se do fermentačního média po intervalech 6 hodin dávkovala uhlíkatá směs o tomto složení: koncentrovaný hydrolyzát dřeva (10,5 % hm. redukujících látek) 85 ml, koncentrovaná kyselina octová (99% obj.) 10 ml a koncentrovaný roztok hydroxidu amonného (26% obj.) 5 ml; množství dávkované směsi se pohybovalo mezi 5–7% obj., vztaženo na objem média ve fermentační baňce; pH média se množstvím dávkované směsi udržovalo současně mezi hodnotami 6,8 až 7,0. Při pokusech ve dvoulitrových fermentačních tancích bylo 50 ml inokula zaočkováno do 800 ml fermentačního média.

Tabulka 2. Produkce L-lysinu u kmene *Corynebacterium glutamicum* 7/11 na fermentačním médiu se sacharosou a melasou a dávkováním uhlíkaté směsi

C-zdroj fermentačního média	Dávkování uhlíkaté směsi	Produkce L-lysinu [g/l média/ . 72 h]
Sacharosa 10 % hm.	— +	24,0 30,6
Melasa 10 % obj.	— +	15,6 28,8

Tabulka 3. Produkce L-lysinu u kmene *Corynebacterium glutamicum* na médiích s limitovanými koncentracemi sacharosy a dávkováním uhlíkaté směsi v měřítku dvoulitrových fermentačních tanků

Obsah sacharosy v médiu % hm.	Aplikace uhlíkaté směsi	Produkce L-lysinu [g/l média . 72 h]
10	—	27,0
10	+	37,0
8	+	33,0
6	+	25,7
4	+	16,5

tačního média; kultivace probíhala při teplotě 29 °C, vzdušnění 0,5–0,8 obj. min.⁻¹, frekvence míchání 6,7 Hz. Koncentrace sacharory ve fermentační půdě se pohybovala od 4–10 % hm. Uhlíkaté zdroje: sacharosa technická, melasa řepná (60% hm. sacharosy), kyselina octová (99% hm.), octan sodný krystalický, koncentrovaný hydrolyzát dřeva (10,5% hm. redukujících látek) s obsahem jednotlivých složek jak uvádí *tabulka 1*. Analytické metody: stanovení L-lysinu, redukujících látek, obsah sacharidických složek hydrolyzátu dřeva je uvedeno v publikacích [1, 2, 3].

VÝSLEDKY A DISKUSE

Experimentální práce s kmenem *Corynebacterium glutamicum* 7/11 v laboratorním měřítku s použitím sacharosového i melasového média prokázaly, že po vyčerpání klasického zdroje uhlíku je kultura schopna asimilovat cukerné složky hydrolyzátu dřeva spolu s kyselinou octovou. Přítomnost inhibičně působících látek hydrolyzátu, tj. furfuralu se za uvedených podmínek kultivace již neprojevuje toxicky a neovlivňuje průběh biosyntézy L-lysinu. Výsledky kontrolních pokusů a experimentů s aplikací kombinace koncentrátního hydrolyzátu dřeva a kyseliny octové jsou uvedeny v *tabulce 2*. Tato zjištění jsme dále ověřovali v měřítku dvoulitrových fermentačních tanků. V první variantě pokusů byl sledován vliv dávkovacích směsí od 18. hodiny kultivace, a to v intervalech po 4 hodinách s použitím fermentačního média s koncentrací sacharosy v rozmezí 4–10 % na počátku kultivace. Hodnota pH média byla standardně udržována na 6,8–7,0 roztokem hydroxidu amonného 10 % obj.

Produkce L-lysinu v měřítku dvoulitrových fermentačních tanků na médiích s limitovanými koncentracemi sacharosy a dávkováním uhlíkatých směsí jsou uvedeny v *tabulce 3*.

Tabulka 4. Produkce L-lysinu u kmene *Corynebacterium glutamicum* 7/11 při aplikaci různých koncentrací kyseliny octové v dávkované uhlíkaté směsi

Fermentační médium	Dávkování uhlíkaté směsi (konc. kyseliny octové v % obj.)	Produkce L-lysinu [g/l média/ . 66 h]
Sacharosa 8 % hm.	—	21,5
	+ (bez kyseliny octové)	27,2
Sacharosa 8 % hm.	+ (s 3,5 % obj. kyseliny octové)	30,5
	+ (se 7,0 % obj. kyseliny octové)	31,6
	+ (s 10 % obj. kyseliny octové)	35,9

Tabulka 5. Produkce L-lysinu u kmene *Corynebacterium glutamicum* 7/11 v měřítku dvoulitrových fermentačních tanků a době kultivace 92 hodin

Fermentační médium sacharosa % hm.	Redukující látky [g/l]	Produkce L-lysinu [g/l média]
7	4,0	36,3
8	4,0	42,4
9	6,0	44,3
10	6,0	48,2

Dále byla sledována problematika aplikace koncentrovaných hydrolyzátů dřeva, a to v kombinaci s 3,5 dále 7,0 a 10 % obj. konc. kyseliny octové a současně byl zkrácen interval dávkování na 3 hodiny. Fermentační médium obsahovalo v iniciační fázi kultivace pouze 8 % hm. sacharosy a dávkování probíhalo již od 12. hodiny kultivace s použitím dávkovací směsi v množství 15 ml. pH média bylo udržováno na hodnotách 7,0–7,2 standardním způsobem. Byla prokázána závislost mezi výší produkce L-lysinu a koncentrací kyseliny octové jako součástí dávkovací uhlíkaté směsi. Monosacharidy hydrolyzátu se podílejí za daných fermentačních podmínek na produkci přibližně 15 % a kyselina octová (podle aplikované koncentrace ve směsi) 9–24 % na celkovém množství produkované aminokyseliny. Výsledky pokusů uvádí *tabulka 4*. Na základě zjištěných výsledků byla sledována možnost použití optimálního složení uhlíkaté směsi, tj. koncentrovaného hydrolyzátu dřeva s 10% kyselinou octovou v dlouhodobé fermentaci, a to s dávkováním od 12. hodiny kultivace v intervalech po 3 hodinách a množství 15 ml směsi. Celkové množství směsi dávkované do fermentačního tanku představovalo 270–300 ml. Iniciační koncentrace sacharosy ve fermentačním médiu se pohybovala mezi 7–10 % hm. Výsledky fermentace jsou uvedeny v *tabulce 5*. Navržený postup biosyntézy L-lysinu představuje do určitého stupně typ dvoufázové fermentace, a to z hlediska aplikace rozdílných zdrojů asimilovatelného uhlíku. V první fázi kultivace je asimilována sacharosa zabezpečující růst a současně iniciaci produkce L-lysinu (12.–18. hodina kultivace); druhá fáze fermentace probíhá na bázi utilizace monosacharidů obsažených v koncentrovaném hydroly-

zátu dřeva a využitím acetátových iontů pro biosyntézu L-lysinu. Uhlíkaté zdroje obsažené v dávkovací směsi se podílejí na produkci přibližně 40 %. Ve dvoulitrových fermentačních tancích se produkce L-lysinu pohybuje mezi 36–42 g/l fermentačního média za 92 hodin kultivace, a to v závislosti na iniciační koncentraci sacharosy v médiu na počátku kultivace.

Dosažené výsledky produkce L-lysinu v uvedeném fermentačním měřítku ukazují na reálnou možnost aplikace koncentrovaných hydrolyzátů dřeva a jejich kombinaci s kyselinou octovou ve vyšším fermentačním stupni s cílem vypracovat technologický postup pro průmyslovou přípravu na bázi těchto netradičních uhlíkatých surovin.

Literatura

- [1] BULANT V.: Sborník „Bilkoviny, jejich produkce a využití“, Praha 1985
- [2] PELECHOVÁ, J., SMÉKAL, F., BULANT, V., KRUMPHANZL, V.: Kvasný průmysl, 25, 1979, s. 174
- [3] SMÉKAL, F., PELECHOVÁ, J., KINDLOVÁ, E., KRUMPHANZL, V.: Kvasný průmysl, 26, 1980, s. 200
- [4] TOMÍČEK, O.: Kvantitativní analýza, Praha 1954
- [5] JANIČEK, G.: Rukověť potravinářské analytiky, Praha 1962

Smékal, F. - Pelechová, J. - Krumphanzl, V.: Biosyntéza L-lysinu na bázi hydrolyzátu dřeva a kyseliny octové u *Corynebacterium glutamicum* II. Dvoufázové fermentace. Kvas. prům., 27, 1981, č. 12, s. 276–278.

Produkční kmen *Corynebacterium glutamicum* 7/11 hromadí ve fermentačním médiu L-lysin při kultivaci v sacharosovém nebo melasovém médiu za podmínek dávkování uhlíkaté směsi obsahující koncentrovaný hydrolyzát dřeva a kyselinu octovou. Výsledky získané v laboratorním měřítku byly ověřeny ve dvoulitrových fermentačních tancích, kdy za podmínek optimálního složení uhlíkaté směsi, vhodného intervalu dávkování a množství směsi bylo dosaženo produkce mezi 36–48 g L-lysinu/l fermentačního média za 92 hodin kultivace.

Смекал, Ф., Пелехова, Я., Крумпханзл, В.: Биосинтез L-лизина на базе гидролизата древесины и уксусной кислоты в случае *Corynebacterium glutamicum* II Двухфазная ферментация. Квас. прум., 27, 1981, № 12, стр. 276–278.

Штамм *Corynebacterium glutamicum* 7/11 накапливает

в ферментационной среде L-лизин при культивировании на сахарозной или мелассовой среде и в условиях дозирования углеродосодержащей смеси, в которую входит гидролизат древесины и уксусная кислота. Результаты, полученные в лабораторном масштабе проверялись в ферментационных танках, емкостью в два литра, и при условиях оптимального состава углеродистой смеси, удобного интервала дозирования и количества смеси была достигнута продукция 36–48 L-лизина/л ферментационной среды в течение 92 часов культивирования.

Smékal, F. - Pelechová, J. - Krumphanzl, V.: Biosynthesis of L-Lysine Produced by the *Corynebacterium glutamicum* Strain in Media Consisting of Wood Hydrolysate and Acetic Acid. Part II. Two-Stage Fermentation. Kvas. prům. 27, 1981, No. 12, pp. 276–278.

During a cultivation of the strain *Corynebacterium glutamicum* 7/11 on saccharose or molasses medium with an addition of a mixture containing the concentrated wood hydrolysate and acetic acid, L-Lysine is accumulated in the broth. The results from shake flask cultivations were verified in 2-litre fermenters. With the optimum composition of a carbon source mixture, a proper dose-interval and a quantity of the mixture, the production of 36–48 g L-Lysine per litre of the cultivation broth was obtained during 92 hours.

Smékal, F. - Pelechová, J. - Krumphanzl, V.: Biosynthese des L-Lysins auf Basis des Holzhydrolysats und der Essigsäure bei *Corynebacterium glutamicum*. II. Zweiphasen-Fermentation. Kvas. prům. 27, 1981, No. 12, S. 276–278.

Der Produktionsstamm *Corynebacterium glutamicum* 7/11 häuft im Fermentationsmedium L-Lysin an bei Kultivation auf Saccharose- oder Melassemedium und unter Bedingung der Dosierung einer kohlenstoffhaltigen Mischung, die konzentriertes Holzhydrolysat und Essigsäure enthält. Die im Laborausmaß erzielten Ergebnisse wurden in 2-Liter-Fermentationstanks überprüft. Bei diesen Versuchen wurde bei Einhaltung der optimalen Zusammensetzung der kohlenstoffhaltigen Mischung, des geeigneten Dosierungsintervalls und der Menge der Mischung die Produktion zwischen 36–48 g L-Lysin pro Liter Fermentationsmedium im Verlauf der 92-stündigen Kultivation erreicht.