

Produkce L-lysinu při aplikaci nestandardních zdrojů dusíku

863.15:547.466.4

RNDr. FRANTIŠEK SMÉKAL, CSc., PhMr. VLADIMÍR BULANT, Ing. EVA KINDLOVÁ, Ing. MARTINA MAZALOVÁ, Ing. STANISLAV ULBERT, Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

Studium biosyntézy L-lysinu se v současné době zabývá řešením aplikace dusíkatých zdrojů se zaměřením na domácí suroviny s cílem náhrady dosud používaných hydrolyzátů dovážené arašídové mouky. Na základě analýz, dostupnosti a cenových relací se ukazují jako vhodné zdroje dusíku pro fermentaci lysinu extrahovaný řepkový nebo lněný šrot a dále bavlníkový šrot resp. jejich kyselé hydrolyzáty; jako zdroj dusíku pro průmyslovou výrobu lysinu se v Sovětském svazu aplikují hydrolyzáty krmných kvasnic [1]. Některé fermentační postupy využívají jako zdrojů dusíku hydrolyzáty bílkovin z arašídové nebo sójové mouky [2, 3], dále hydrolyzovaný kasein [4] nebo dusíkaté substráty na bázi NZ-aminu [5]. Cílem práce bylo ověřit možnosti fermentační přípravy L-lysinu u kmenů *Brevibacterium flavum* a *Corynebacterium glutamicum* při aplikaci klasického sacharosového postupu a hydrolyzátů nestandardních zdrojů dusíku v laboratorním měřítku.

MATERIÁL A METODY

Mikroorganismy: jako experimentální materiál byly v pokusech používány tyto produkční kmeny: *Brevibacterium flavum* (hom⁻, AEC^r) a *Corynebacterium glutamicum* (hom⁻, leu⁻ a AMTB^r) ze sbírky mikroorganismů VÚAB Roztoky u Prahy. Použité zkratky: hom⁻, leu⁻ = produkční kmeny vyžadují k růstu homoserin a leucin; AEC^r = rezistence vůči S-aminoethylcysteinu; AMTB^r = rezistence na S-aminomethylthiomásele kyselinu. Kmeny se uchovávají na MPA agaru při teplotě 5 °C; pasážování po 21 dnech.

Příprava hydrolyzátů dusíkatých zdrojů:

do Erlenmayerovy baňky objemu 2 litrů se naváží 150 g dusíkatého substrátu a přidá se 450 ml destilované vody; po rozmíchání se postupně přidá 60 ml 96% kyseliny sírové. Nádobu se dále ponechá stát při laboratorní teplotě 6–8 hodin. Vlastní hydrolyza probíhá při 120 °C v autoklávu po dobu 3–4 hodin. Po ochlazení se k hydrolyzátu přidá 350 ml destilované vody a filtruje se (papírový filtr „Filtro 388 m“); materiál zachycený na filtru se dále promyje 250 ml destilované vody s teplotou 60 °C. Uchovávání hydrolyzátů při 5 °C.

Analytické metody: kvantitativní analýza aminokyselin byla provedena na automatickém analyzátoru aminokyselin AA-881 (Mikrotechna, Praha) metodou podle [6] a analýza L-lysinu oscilopolarografickou metodou [7].

POSTUPY

Složení inokulačního média: varná baňka 500 ml se plní 50 ml inokulačního média tohoto složení: sacharosa techn. 3 g, octan sodný kryst. 2 g, kukuřičný výluh (60 % hm. sušiny) 3 g, voda destilovaná ad 100 ml; pH média se upraví na 7,0. Po zaočkování se baňky kultivují na rotační třepačce při teplotě 29 °C po dobu 18–24 hodin. Vyrostlou kulturou se v množství 10 % obj. zaočkují 500 ml varné baňky, které obsahují 20 ml fermentačního média tohoto složení: sacharosa techn. 18 g, hydrolyzát dusíkatého zdroje (6,8–10,2 % celk. N) 20 ml, kukuřičný výluh (60 % hm. sušiny) 1 g, síran amonný kryst. 1 g, hydrogenfosforenan draselný 0,1 g, síran hořečnatý kryst. 0,01 g, uhličitán vápenatý mletý 3 g, voda dest. ad 100 ml; pH média po sterilaci 7,0. Po zaočkování se baňky kultivují na rotační třepačce (240 ot. min⁻¹) při teplotě

29 °C při úpravě média v průběhu kultivace 10% roztokem amoniaku na hodnotu 7,0–7,2.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Produkční mutant *Brevibacterium flavum* vyžaduje k růstu homoserin, který může být ve fermentačním médiu nahrazen threoninem a methioninem podobně jako další produkční kmen *Corynebacterium glutamicum*, který je současně dependentní na leucin. Z hlediska těchto růstových požadavků musí hydrolyzáty nestandardních zdrojů dusíku obsahovat odpovídající koncentrace požadovaných aminokyselin. Proto se provádí kvantitativní analýza aminokyselin u testovaných dusíkatých substrátů. Z hlediska genetických charakteristik mutantních kmenů jsou významné koncentrace threoninu, methioninu a leucinu, jak je uvedeno v tabulce 1.

Tabulka 1. Obsah threoninu, methioninu a leucinu v hydrolyzátech nestandardních zdrojů dusíku (mg/ml)

Amino-kyselina	Hydrolyzát N-zdroje				
	řepkový šrot	bavlníkový šrot	krmné droždí	lněný šrot	arašídová mouka
threonin	1,31	0,74	0,83	0,90	0,70
methionin	0,76	0,74	0,44	0,52	0,57
leucin	2,31	2,42	2,11	1,48	1,98
celkové množství	4,38	3,90	3,38	2,90	3,25

Z analytických hodnot je zřejmé, že vysoké koncentrace požadovaných aminokyselin jsou přítomny v hydrolyzáte extrahovaného řepkového šrotu. Množství leucinu v hydrolyzátech kolísá mezi 0,19–0,24 % s výjimkou lněného šrotu s koncentrací 0,14 %. Celkové množství esenciálních aminokyselin v experimentálních hydrolyzátech se pohybuje mezi 0,29–0,43 %. U kontrolní arašídové mouky představuje 0,32 %. Množství threoninu a methioninu v hydrolyzátech arašídové mouky a krmného droždí jsou nižší než v ostatních typech experimentálních zdrojů dusíku.

Produkce L-lysinu u kmene *Brevibacterium flavum* na bázi sacharosové technologie s použitím nestandardních zdrojů dusíku uvádí tabulka 2. Výsledky jsou v průměru nižší o 3–7 g/l fermentačního média ve srovnání s průměrnou hodnotou produkce lysinu v kontrolním postupu s hydrolyzátem arašídové mouky. V případě hydrolyzáte krmných kvasnic je produkce lysinu značně nižší proti výtěžku v kontrolním postupu. Negativní vliv na biosyntézu lysinu mohou mít pravděpodobně fosfátové ionty přítomné ve značném množství v hydrolyzáte droždí. Současně je možno uvažovat o zvýšené citlivosti produkční mutanty *Brevibacterium flavum* na přítomnost fosfátů ve fermentačním médiu.

Tabulka 2. Produkce L-lysinu u kmene *Brevibacterium flavum* na bázi sacharosové technologie s použitím nestandardních zdrojů dusíku

Zdroj dusíku	Produkce L-lysinu v g/l fermentačního média/96—120 hodin kultivace
hydrolyzát arašídové mouky (kontrola)	44—48 g/l
hydrolyzát řepkového šrotu	37—43 g/l
hydrolyzát bavlníkového šrotu	36—42 g/l
hydrolyzát krmného droždí (<i>Candida sp.</i>)	20—24 g/l
hydrolyzát lněného šrotu	40—45 g/l

Tabulka 3. Produkce L-lysinu u kmene *Corynebacterium glutamicum* na bázi nestandardních zdrojů dusíku na bázi sacharosové technologie

Zdroj dusíku	Produkce L-lysinu v g/l fermentačního média/93—120 hodin kultivace
hydrolyzát arašídové mouky (kontrola)	33—40 g/l
hydrolyzát řepkového šrotu	40—45 g/l
hydrolyzát bavlníkového šrotu	33—38 g/l
hydrolyzát krmného droždí (<i>Candida sp.</i>)	40—44 g/l
hydrolyzát lněného šrotu	42—45 g/l

Testováním produkčního kmene *Corynebacterium glutamicum* při aplikaci stejné série hydrolyzátů nestandardních zdrojů dusíku byly ve fermentaci L-lysinu získány výtěžky přehledně uvedené v tabulce 3. Produkce lysinu jsou dobře srovnatelné s výtěžky aminokyseliny v kontrolním postupu; ve fermentaci s použitím hydrolyzátů řepkového, lněného šrotu a krmného droždí byly zjištěny vyšší produkce než v kontrolním postupu. Ukazuje se, že pro jednotlivé produkční mutanty kmenů *Brevibacterium flavum* a *Corynebacterium glutamicum* je nezbytné stanovit optimální množství jednotlivých hydrolyzátů (% obj. ve fermentačním médiu) pro zabezpečení růstu a produkce L-lysinu pro dosažení výtěžků jako v kontrolním postupu s dosud používaným hydrolyzátem arašídové mouky.

Uvedené nestandardní zdroje dusíku pro fermentační přípravu L-lysinu představují rezervní suroviny dostupné v dostatečném množství a přitom cenově levnější oproti dovážené arašídové mouce. Tyto základní poznatky s aplikací nových zdrojů dusíku pro fermentační technologii L-lysinu mohou po ověření ve vyšších fermentačních stupních být podkladem pro vypracování ekonomicky výhodného postupu průmyslové přípravy této významné esenciální aminokyseliny.

Literatura

- [1] ZAJCEVA, Z. M.: Úspěchy mikrobiologie, 11, 1976, s. 159
- [2] Franc. patent, spis č. 2 033 119, 1970
- [3] NSR patent, spis č. 2 321 461, 1973
- [4] USA patent, spis č. 3 595 751, 1972
- [5] Japonský patent, spis č. 515 77, 1985

- [6] MOORE, S., STEIN, W. H.: J. Biol. Chem., 176, 1978, s. 367
- [7] BULANT, V.: Sborník „Bilkoviny, jejich produkce a využití“, Praha, 1985.

Smékal, F. - Bulant, V. - Kindlová, E. - Mazalová, M. - Ulbert, S.: Produkce L-lysinu při aplikaci nestandardních zdrojů dusíku. Kvas. prům., 28, 1982, č. 2, s. 39—40.

Byla studována produkce L-lysinu u kmenů *Brevibacterium flavum* a *Corynebacterium glutamicum* na bázi sacharosové technologie při aplikaci nestandardních zdrojů dusíku, jako jsou hydrolyzáty extrahovaného řepkového, lněného a bavlníkového šrotu a dále hydrolyzáty krmného droždí. Aplikací těchto N-zdrojů bylo dosaženo produkci mezi 36—45 g L-lysinu/l fermentačního média za 96—120 hodin kultivace. Výsledky ukazují na reálnou možnost náhrady používané arašídové mouky některými tuzemskými surovinami, a to za podmínek optimalizace obsahu dusíkatého zdroje ve fermentačním médiu.

Смекал, Ф., Булант, В., Киндлова, Е., Мазалова, М., Ульберт, С.: Продукция L-лизина при применении нестандартных источников азота. Квас. прум., 28, 1982, No 2, стр. 39—40.

Была исследована продукция L-лизина для штаммов *Brevibacterium flavum*, *Corynebacterium glutamicum* на базе сахаросной технологии с применением нестандартных источников азота, как гидролизаты экстрагируемого, льняного и хлопчатного помолов, далее гидролизаты кормовых дрожжей. Приложением этих источников азота было достигнуто продукции от 36 до 45 г L-лизина / л ферментационной среды в течение 96—120 часов культивирования. Результаты показывают реальную возможность замены используемой арахидной муки на некоторые отечественные виды сырья, и то в условиях оптимизации содержания азотистого источника в ферментационной среде.

Smékal, F. - Bulant, V. Kindlová, E. - Mazalová, M. - Ulbert, S.: Production of L-Lysine Using Non Standard Nitrogen Sources. Kvas. prům. 28, No. 2, pp. 39—40.

The production of L-Lysine with the strains *Brevibacterium flavum* and *Corynebacterium glutamicum* using saccharose technology and non-standard nitrogen sources such as hydrolysates of extracted rape, flax and cotton-plant crush and hydrolysates of fodder yeast was studied. Using these N-sources the production in a range from 36 to 45 g L-Lysine per litre of a cultivation broth in 96—120 h of the culture was achieved. The results show a possibility to substitute peanut meal by inland raw materials. In addition, using these substitutes the quantity of N-source in the culture medium can be optimized.

Smékal, F. - Bulant, V. - Kindlová, E. - Mazalová, M. - Ulbert, S.: Produktion des L-Lysins bei der Applikation nicht üblicher Stickstoffquellen. Kvas. prům. 28, 1982, No. 2, S. 39—40.

Es wurde die Produktion des L-Lysins bei den Stämmen *Brevibacterium flavum* und *Corynebacterium glutamicum* auf der Basis der Saccharosetechnologie bei Applikation nicht üblicher Stickstoffquellen wie Hydrolysate des extrahierten Raps-, Flachs- und Baumwollschrots und Hydrolysate der Futterhefe studiert. Durch Applikation dieser N-Quellen wurde die Lysinproduktion zwischen 36 und 45 g L-Lysin/l Fermentationsmedium im Verlauf einer 96—120stündiger Kultivierung erreicht. Die Ergebnisse zeigen die reale Möglichkeit des Ersatzes des Erdnußmehls durch inländische Rohstoffe, und zwar unter der Bedingungen der Optimalisation des Gehalts der Stickstoffquelle in dem Fermentationsmedium.