

## Biosyntéza L-lysinu na bázi hydrolyzátu papíru u *Corynebacterium* a *Brevibacterium* sp.

Ing. JANA PELECHOVÁ, CSc., Ing. REINER SEIFERT, CSc., Vysoká škola chemicko-technologická, Praha  
RNDr. FRANTIŠEK SMÉKAL, CSc., Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

Celosvětový nedostatek bílkovin jako základní složky potravy pro člověka a hospodářská zvířata je možno částečně kompenzovat přípravou mikrobiálních bílkovin a některých aminokyselin získaných záměrnou biosyntézou. Význam fermentační přípravy těchto látek spočívá v tom, že je možno je získat v nepoměrně kratší době ve srovnání se zemědělskou nebo živočišnou produkcí.

L-aminokyseliny připravené vybranými produkčními mikroorganismy jsou přímo použitelné pro přípravu krmných směsí nebo jako složka potravy. Mimořádný význam mají esenciální aminokyseliny, např. L-lysin. Fermentační průmyslová výroba vyžaduje však pro biosyntézu L-lysinu značné množství uhlíkatého zdroje jako je sacharosa nebo melasa, které jsou opět vázány na zemědělskou výrobu. Vzhledem k nedostatku a zvýšeným cenám těchto klasických uhlíkatých substrátů pro fermentační procesy je již několik let snaha vypracovat nové technologické postupy na neklasických zdrojích uhlíku, např. kyselině octové, ethanolu [1, 2].

V současné době jsou potenciální uhlíkatou surovinou pro řadu mikrobiálních procesů lignocelulózové a celulózy materiály, které jsou levné a neustále se v přírodě obnovují. Celulózu rozštěpenou na jednoduché sacharidy je možno použít jako energetickou složku krmiva, podobně jako melasu, nebo je možno získaný sacharidický roztok využít jako uhlíkatý substrát pro kultivaci mikroorganismů k získání řady významných produktů nebo hodnotného bílkovinného krmiva.

Problematickou fermentační přípravu L-lysinu na bázi hydrolyzátu dřeva a rašeliny se zabýval Kalinš [3]. Jak uvádí ve své práci, pro výtěžek 20–30 g L-lysinu v litru média je nutný obsah monosacharidů v médiu 8–10 % hm. Vzhledem k tomu, že v hydrolyzátech dřeva připravených zředěnou kyselinou sírovou je dosahováno pouze 3–4 % hm. redukujících látek a vedle toho vznikají některé toxické látky (např. 2-furankarbaldehyd), je možno nahradit melasu hydrolyzátem dřeva jen částečně; za těchto podmínek bylo získáno 20–25 g L-lysinu/l média.

V předchozích publikacích [4, 5] jsme uvedli výsledky studia biosyntézy L-lysinu na bázi hydrolyzátu dřeva a kyseliny octové u *Corynebacterium glutamicum*. Navržený postup biosyntézy L-lysinu představoval do určitého stupně typ dvoufázové fermentace, a to z hlediska aplikace rozdílných zdrojů uhlíku. V první fázi kultivace je asimilována sacharosa, zabezpečující růst a současně iniciaci produkce L-lysinu, v druhé fázi kultivace jsou utilizovány monosacharidy obsažené v koncentrovaném hydrolyzáte dřeva (10 % hm. redukujících látek) a acátátové ionty. Za těchto podmínek se pohybovala produkce L-lysinu ve dvoulitrových fermentačních tancích mezi 33–42 g/l média za 92 hodin.

Japonští autoři publikovali fermentační postup přípravy L-lysinu na bázi hydrolyzátu papíru [6]. Celulózový materiál je nejprve acetylován anhydridem kyseliny octové; acetylovaná celulóza je pak hydrolyzována roztokem 10 % hm. kyseliny sírové při 120 °C po dobu dvou hodin. Po neutralizaci hydrolyzáta a doplnění vhodnými minerálními solemi a růstovými faktory nastává vlastní fermentace s produkčním kmenem *Brevi-*

*bacterium flavum* FERM-P 1708. Produkce za 72 h dosahovala 12 g L-lysinu v litru média.

Rozštěpení lignocelulózových materiálů je možno provést chemickou hydrolyzou minerálními kyselinami nebo enzymovou hydrolyzou pomocí celulótických mikroorganismů.

Chemické hydrolyze je v posledních letech opět věnována značná pozornost, o čemž svědčí řada patentů, publikací a přehledných prací [7, 8, 9]. V předkládané práci byl pro hydrolyzu papíru zvolen postup fluorovodíkový [10].

Při biodegradaci jsou využívány celulózy systémy mikrobiálních druhů rodu *Trichoderma*, *Sporotrichum*, *Penicillium*, *Fusarium* a další. Přestože biodegradace lignocelulózových komplexů je v současné době předmětem studia a výzkumu mnoha pracovníků a vědeckých týmů, zůstává biokonverze těchto komplexů s ohledem na stav jejího experimentálního a průmyslového zvládnutí stále problematikou alternativou chemických nebo fyzikálně chemických postupů.

### Materiál a metodika

**Mikroorganismy:** V pokusech byly používány produkční kmeny ze sbírky VÚAB, a to *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21544, vyžadující homoserin, leucin a současně rezistentní vůči kyselině aminothiomásečné (AMTB), *Corynebacterium glutamicum* 7/11, vyžadující homoserin a rezistentní na účinek S-aminoethylcysteinu (AEC), *Corynebacterium glutamicum* 49 a *Brevibacterium* sp. vyžadující homoserin. Kmeny jsou udržovány na šikmých masoseptonových agarrech pasážováním. Přeočkování kmenového materiálu je vždy po 21 dnech.

**Složení inokulačního média:** sacharosa technická 20 g, octan sodný kryst. 40 g, kukuřičný extrakt (60 % hm. sušiny) 30 g, voda destilovaná ad 1000 ml; pH média bylo upraveno na 7. Inokulační materiál: po zaočkování baňky se kultivují na rotační třepačce (240 ot. min<sup>-1</sup>) při teplotě 29 °C po dobu 18–24 h. Vyrostlou kulturou se v množství 10 % obj. zaočkují 500 ml varné baňky, které obsahují 20 ml fermentačního média.

**Složení fermentačního média:** hydrolyzát arašidové mouky 200 ml, kukuřičný extrakt (60 % hm. sušiny) 10 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,1 g, CaCO<sub>3</sub> 35 g, destilovaná voda ad 1000 ml. Zdrojem uhlíku a energie byl hydrolyzát papíru připravený enzymovou hydrolyzou, nebo fluorovodíkovým postupem. Koncentrace redukujících látek po přidání hydrolyzáta byla asi 50–60 g v 1 litru média.

Ke kultivaci byly použity 500 ml Erlenmayerovy baňky s obsahem 20 ml média. Všechny živné půdy byly sterilovány 30 minut při tlaku 0,12 MPa.

**Analytické metody:** stanovení L-lysinu, celkových redukujících látek a jednotlivých monosacharidů bylo uvedeno v předchozích publikacích [4, 5, 11]; stanovení lehce (PS<sub>L</sub>) a těžce (PS<sub>T</sub>) hydrolyzovatelných polysacharidů, celulózy, popela a sušiny papíru [12].

### Výsledky a diskuse

Pro štěpení celulózy materiálu enzymovou hydrolyzou byl zvolen vzorek papíru P<sub>1</sub> obsahující nebělenou



Tabulka 1. Analytické hodnocení vzorků papíru (% hm.)

Vzorek papíru	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>
celulóza	88,1	52,5
PS <sub>L</sub>	4,6	12,4
PS <sub>T</sub>	72,3	48,5
popel	7,2	10,5
vlhkost	9,8	7,3

- P<sub>1</sub> — směs nebělené sulfátové buničiny a potištěné makulatury ve váhovém poměru 1:1  
P<sub>2</sub> — novinový papír, směs neplněného novinového papíru „Rudé právo“ a natíraného novinového papíru „Tribuna“  
PS<sub>L</sub> — obsah lehce hydrolyzovatelných polysacharidů  
PS<sub>T</sub> — obsah těžce hydrolyzovatelných polysacharidů  
% hm — vztaženo na absolutně suchý výchozí papír

Tabulka 2. Obsah monosacharidů v hydrolyzátech papíru po stanovení PS<sub>L</sub> a PS<sub>T</sub> (g/100 g suchého papíru)

Vzorek papíru	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>
monosacharidy		
glukosa	72,0	40,7
xylosa	7,5	8,6

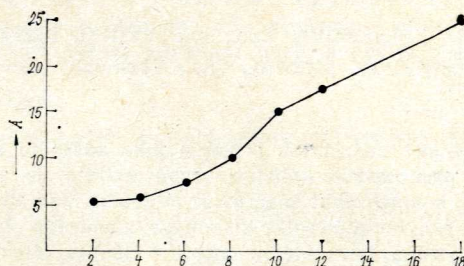
Tabulka 3. Složení sacharidického podílu v hydrolyzátu papíru P<sub>2</sub> (mg/ml)

redukující látky	99,2
glukosa	60,8
xylosa	11,7
arabinosa	7,7
disacharidy	5,8
trisacharidy a vyšší	11,3

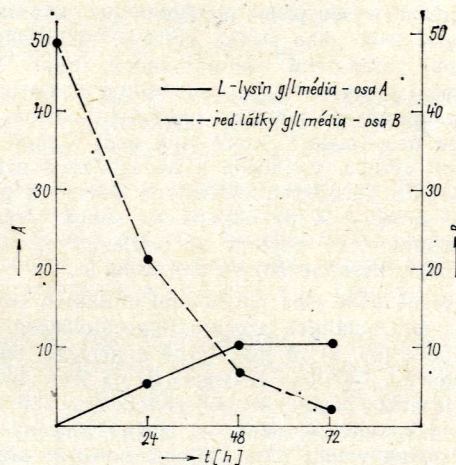
sulfátovou buničinu s příměsí novinového papíru, který reprezentuje sběrový papír s vyšším obsahem celulózy (tabulka 1–3). Vzorek byl předem rozvlákněn za mokra, potom odvodněn nejprve odsáváním na nuči až na sušinu asi 20 % hm, potom sušen v sušárně při 105 °C do vlhkosti 10 % hm. K enzymové hydrolyze bylo 20 g této vlákniny nejprve resuspendováno ve 100 ml citrátového pufru (pH = 4,8) a ponecháno v autoklávu po dobu 30 minut při 0,12 MPa. Celulázový substrát byl zředěn 20 ml citrátového pufru a přidáno 100 mg celulázového komplexu *Trichoderma reesei* (preparát s aktivitou 4.493 UE z VÚPP Praha). Zaočkováný substrát byl inkubován zpočátku při 55 °C, dále při 45 °C 18 hodin. V odebíraných vzorcích byl v supernatantu po odstředění stanovován obsah celkových redukujících látek. Průběh enzymové hydrolyzy je znázorněn na obr. 1.

Takto získaný hydrolyzátní papír s obsahem 2,5 % hm. redukujících látek byl vakuově zahuštěn až na koncentraci 5 % hm. a použit pro přípravu média. Po zaočkování kmenem *Corynebacterium glutamicum* 21544 bylo po 48 hodinách kultivace zjištěno 10 g L-lysinu v 1 litru

média. Toto množství se již v dalších hodinách nezvyšovalo (obr. 2).



Obr. 1. Průběh enzymové hydrolyzy papíru, A — obsah redukujících látek (g/l média)

Obr. 2. Biosyntéza L-lysinu u kmene *Corynebacterium glutamicum* 21544 v médiu s hydrolyzátem papíru (enzymová hydrolyza)

Chemická hydrolyza bezvodým fluorovodíkem. 200 g vzorku P<sub>2</sub> — novinový papír — bylo v reaktoru podrobeno hydrolyze bezvodou kyselinou fluorovodíkovou při teplotě 15–20 °C po dobu 45 min za normálního tlaku. Po odehnání kyseliny fluorovodíkové byl reakční produkt rozpuštěn v horké vodě a po separaci nezreagovaného podílu byla provedena neutralizace hydroxidem vápenatým. Získaný roztok oligosacharidů byl podroben dohydrolyze zředěnou kyselinou sírovou v autoklávu při teplotě 130 °C 100 minut. Po opětovné neutralizaci hydroxidem vápenatým a separaci síranu vápenatého byl takto získaný hydrolyzátní papír použit jako uhlíkatý substrát do fermentační pudy.

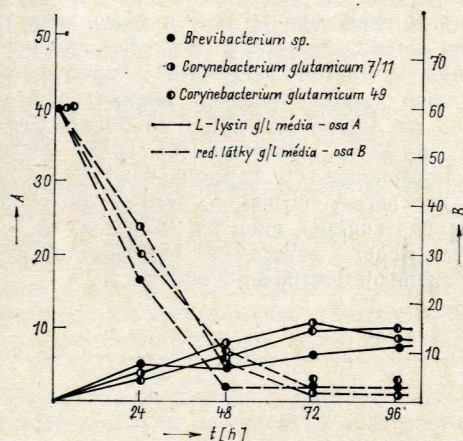
Hydrolyzátní papír připravený fluorovodíkovým postupem obsahoval 10 % hm. redukujících látek. Po přidání tohoto roztoku jako jediného zdroje uhlíku a energie do fermentační pudy byla počáteční koncentrace redukujících látek 60 g/l média. Vzhledem k poměrně malému objemu připraveného hydrolyzátního papíru nebylo možno, právě tak jako u hydrolyzátního získaného enzymově, zkoncentrovat roztok na optimální koncentraci redukujících látek pro produkci L-lysinu, tj. asi 25 % hm, a navíc stanovená hodnota redukujících látek v hydrolyzátech nepředstavuje pouze monosacharidy.

Biosyntéza L-lysinu v médiu s hydrolyzátem papíru připraveným chemickou hydrolyzou je uvedena na obr. 3.

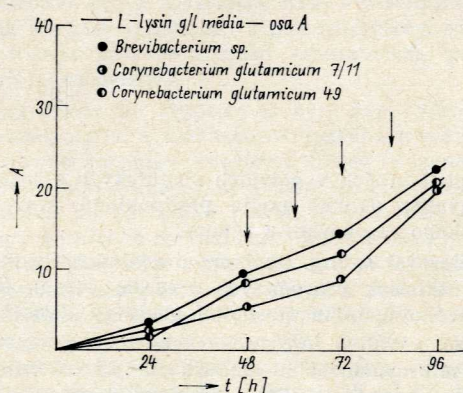
Jak vyplývá z obr. 2 a 3, ve 48. h, resp. v 72. h kultivace bylo získáno 10–12 g L-lysinu v litru média a bio-



syntéza již dále nepokračovala, ať již v důsledku poklesu celkových redukujících látek, nebo následkem vyčerpání utilizovaných monosacharidů.



Obr. 3. Biosyntéza L-lysinu u kmenů *Brevibacterium* sp. a *Corynebacterium glutamicum* v médiu s hydrolyzátem papíru (chemická hydrolyza)



Obr. 4. Biosyntéza L-lysinu u kmenů *Brevibacterium* sp. a *Corynebacterium glutamicum* v médiu s hydrolyzátem papíru a sacharosou

V dalším studiu této problematiky se ukázala vhodnost kombinace hydrolyzátu papíru a sacharosy, která byla přidávána do fermentační půdy v průběhu kultivace (2 ml roztoku 50 % hm. sacharosy po 12 hodinách), takže k médiu s původním obsahem 60 g redukujících látek v litru bylo postupně přidáno 100 g sacharosy. Sacharosa zabezpečovala dostatečný růst a současně iniciaci produkce L-lysinu. Za těchto podmínek bylo dosaženo 20–24 g L-lysinu v 1 médiu za 96 h kultivace. Tyto orientační pokusy ukázaly na možnost částečné náhrady potřebného množství sacharosy (optimální koncentrace 20 % hm.) pro produkci L-lysinu zdrojem uhlíku z hydrolyzátu papíru.

Výsledky našich pokusů s kultivací produkčních kmenů *Brevibacterium* sp. a *Corynebacterium glutamicum* na hydrolyzátech papíru jsou v souladu s literárními údaji autorů, zabývajících se podobnou problematikou [14, 15]. Perspektivy aplikace hydrolyzátu lignocelulózových materiálů naznačují v současné době např. patentové údaje japonských autorů [6, 13]. Potvrzuje se, že zvládnutí hydrolyzačních postupů lignocelulózových a celulózo- vých materiálů s cílem získat relativně levné hydrolyzáty s vysokou koncentrací monosacharidů a eliminaci látek inhibujících růst mikroorganismů, může vést k roz-

sáhlému použití různých druhů lignocelulózových a celulózo- vých odpadních surovin pro produkci biologicky významných látek, např. i L-lysinu.

#### Literatura

- [1] PELECHOVÁ, J., SMÉKAL, F., KOURA, V., PLACHÝ, J., KRUMPHANZL, V.: Folia Mikrobiologica 25, 1980, s. 341
- [2] PELECHOVÁ, J., SMÉKAL, F., BULANT VL., KRUMPHANZL, VL.: Kvas. prům., 25, 1979, s. 249
- [3] KALNINŠ, A. JA., VALDMAN, A. R., ANDERSON, P. P., DAUGAVJETIS, M. O.: Les — selskomu chozajstvu, Moskva 1978
- [4] SMÉKAL, F., PELECHOVÁ, J., KINDLOVÁ, E., KRUMPHANZL, VL.: Kvas. prům., 26, 1980, s. 200
- [5] SMÉKAL, F., PELECHOVÁ, J., KRUMPHANZL, VL.: Kvas. prům., 26, 1981, s. 276
- [6] Patent Japonska 78 113 041, 1978
- [7] WEGENER, G.: Holz als Roh- und Werkstoff, 40, 181–185, 209–214 (1982)
- [8] GOLDSTEIN, I. S.: Tappi 63 165, 141, 1980
- [9] KOROLKOV, I. I.: Perkolacionnyj gidroliz rastitel'no-vo syrja. Lesnaja promyšlennost', Moskva 1968
- [10] SEIFERT, R., PELECHOVÁ, J., BRADÍKOVÁ, A., RUŽIČKA, V.: 3. symposium soc. zemí a biotechnologii, duben 1983, Bratislava
- [11] PELECHOVÁ, J., KRUMPHANZL, VL., KADLEC, K., STANĚK, J., SOKOLOV, T.: Kvas. prům., 25, 1979, s. 56
- [12] MELCER, I. a kolekt.: Analytická chemie dřeva, SNTL, Praha 1977
- [13] Patent Japonska 7 88 089, 1979
- [14] Patent NSR 2 100 159, 1972
- [15] Patent Francie 2 033 119, 1970

**Pelechová, J. - Seifert, R. - Smékal, F.: Biosyntéza L-lysinu na bázi hydrolyzátu papíru u *Corynebacterium glutamicum* a *Brevibacterium* sp.** Kvas. prům., 29, 1983, č. 12, s. 279–282.

Produkční kmeny *Corynebacterium glutamicum* a *Brevibacterium* sp. jsou schopny růstu a biosyntézy L-lysinu ve fermentačním médiu obsahujícím jako zdroj monosacharidů hydrolyzát papíru připravený enzymovou nebo chemickou hydrolyzou. Hydrolyzáty papíru mají vzhledem k dosavadním použitým technologiím prozatím relativně nízký obsah monosacharidů, takže produkce L-lysinu byla jen 10–12 g/l fermentačního média. Výtěžku 20–24 g L-lysinu/l média bylo dosaženo ve fermentačních půdách obsahujících hydrolyzát papíru v kombinaci se sacharosou, která zabezpečovala dostatečný nárůst a současně iniciaci produkce L-lysinu.

**Пелехова, Я., Сейферт, Р., Сماعيل, Ф.: Биосинтез Л-лизина на базе гидролизата бумаги для шт. *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium* sp.** Квас. прум. 29, 1983, № 12, стр. 279–282.

Штаммы *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium* sp. способны к размножению и биосинтезу Л-лизина в ферментационной среде, содержащей в качестве источника моносахаридов гидролизат бумаги, полученный путем энзимного или химического гидролиза. Гидролизаты бумаги отличаются ввиды до сих пор применяемых технологий пока относительно низким содержанием моносахаридов, так что продукция Л-лизина составляла только 10–12 г/л ферментационной среды. Выхода 20–24 г Л-лизина/л среды было достигнуто в средах, содержащих гидролизат бумаги в комбинации с сахарозой, которая обеспечивала достаточный рост и одновременно инициирование продукции Л-лизина.

**Pelechová, J. - Seifert, R. - Smékal, F.: Biosynthesis of L-Lysine from Paper Hydrolyzate with *Corynebacterium glutamicum* and *Brevibacterium* sp.** Kvas. prům. 29, 1983, No. 12, p. 279–282.

Production strains *Corynebacterium glutamicum* and *Brevibacterium* sp. are able to growth and synthesize L-lysine in the fermentation medium with the paper hydrolyzate as the source of monosaccharides. The paper



hydrolyzate can be prepared by the enzyme or chemical hydrolysis. With respect to the present technologies, paper hydrolyzates have a relatively low content of monosaccharides. Therefore, the production of L-lysine was only 10–12 g.l<sup>-1</sup> of the fermentation broth. The production of 20–24 g of L-lysine per litre of the medium was achieved in the media where paper hydrolyzate was supplemented with saccharose that permitted the sufficient growth with the simultaneous initiation of the production of L-lysine.

**Pelechová, J. - Seifert, R. - Smékal, F.: Biosynthese des L-Lysins auf Basis des Papierhydrolysats bei *Corynebacterium glutamicum* und *Brevibacterium sp.*** Kvas. prům. 29, 1983, Nr. 12, S. 279–282.

Die Produktionsstämme *Corynebacterium glutamicum* und *Brevibacterium sp.* haben die Fähigkeit des Wachstums und der Biosynthese des L-Lysins im Fermentationsmedium, das als Monosaccharidequelle das durch Enzym- oder chemische Hydrolyse gewonnene Papierhydrolysat enthält. Die mittels der bisher üblichen technologischen Verfahren hergestellte Papierhydrolysate weisen einen relativ niedrigen Monosaccharidgehalt auf, sodaß die L-Lysin-Produktion in diesen Bedingungen nur 10–12 g/l Fermentationsmedium betrug. In Fermentationsmedien, die Papierhydrolysat in Kombination mit Saccharose enthielten, welche die genügende Erhöhung und zugleich auch die Initiation der L-Lysin-Produktion sicherte, wurde eine Ausbeute von 20–24 g L-Lysin/l Fermentationsmedium erzielt.