

Biosyntéza L-lysinu u kmene *Corynebacterium glutamicum* 10-20/60. Nestandardní zdroje dusíku

664.38
663.2 579

Dr. FRANTIŠEK SMÉKAL, CSc., Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy,
Dr. N. I. ŽDANOVA, DrSc., Dr. T. V. LEONOVA, CSc., Vsesvazový vědeckovýzkumný ústav genetiky, Moskva

Klíčová slova: aminokyseliny, L-lysin, biosyntéza, zdroje dusíku, *Corynebacterium glutamicum*

Studium biosyntézy L-lysinu na nestandardních surovinách předpokládá aplikaci dostupných dusíkatých zdrojů jako náhrady za dosud používanou arašídovou nebo sójovou mouku, resp. jejich hydrolyzáty. Jako vhodné zdroje pro fermentační účely přicházejí v úvahu řepkový, lněný nebo bavlníkový šrot a další dusíkaté substráty. Příkladem mohou být hydrolyzáty krmných kvasnic jako složky kultivačního média pro fermentační přípravu L-lysinu [1]. Jako zdroje dusíku jsou dále popisovány hydrolyzáty proteinů, např. kaseinu nebo sójového proteinu a dalších dusíkatých látek [2, 3]. Byla ověřována možnost použití některých náhradních zdrojů dusíku pro fermentační přípravu lysinu u produkčního kmene *Corynebacterium glutamicum* 10-20/60 při použití standardní sacharosové a acetátové technologie v laboratorním měřítku.

Materiál a metody

V pokusech bylo použito produkčního kmene *Corynebacterium glutamicum* 10-20/60, který ke svému růstu vyžaduje homoserin a je rezistentní na S-aminoetyl-L-cystein. Kmen je uchováván na MP agaru při 5 °C a pasážován po třech týdnech. Způsob přípravy hydrolyzátů dusíkatých zdrojů, metoda stanovení L-lysinu oscilopolarograficky a aminokyselinové složení hydrolyzátů byly již popsány v dřívějších pracích [4, 5, 6]. Všechny pokusy byly prováděny v baňkách na rotační třepačce [6, 7 Hz] při 29 °C v laboratorním měřítku.

Výsledky a diskuse

U produkčního kmene *Corynebacterium glutamicum* 10-20/60 byla ověřována biosyntéza L-lysinu na dvou základních typech fermentačních médií; se sacharosou a klasickým zdrojem dusíku (hydrolyzát arašídové mouky) a na médiích, která obsahovala nestandardní zdroje dusíku (hydrolyzáty řepkového, lněného a bavlněného šrotu). Vzhledem ke značně vysokému obsahu celkového dusíku v hydrolyzátech (7–10 mg celk. N/ml) byla ve všech fermentačních médiích jejich koncentrace stejná (20 % obj.). Produkce L-lysinu na uvedených nestandardních zdrojích dusíku u kmene *Corynebacterium glutamicum* 10-20/60 je uvedena v tabulce 1.

Zjištěné rozdíly v produkci aminokyseliny odpovídají odlišnému kvantitativnímu zastoupení některých aminokyselin v hydrolyzátech, které jsou nutné pro růst produkčního mikroorganismu a syntézu L-lysinu. Pro kmen 10-20/60 jsou významná množství treoninu a metioninu a jejich vzájemný poměr v hydrolyzátech. Produkce lysinu v případě řepkového a lněného šrotu jsou srovnatelné s produkcí aminokyseliny při fermentaci s hydrolyzátem arašídové mouky; při aplikaci hydrolyzátu bavlníkové mouky je produkce lysinu nižší než v kontrolním postupu s klasickým hydrolyzátem dusíku.

Z hlediska biosyntézy L-lysinu jsou významná množství použitého hydrolyzátu (% obj.), pro přípravu fermentačních médií, např. rozsah koncentrací mezi 15–30 % obj. hydrolyzátu lněného šrotu ukázal, že postačuje množství 20 % obj. pro dosažení produkce 40 g lysinu .l⁻¹ média

Tabulka 1. Biosyntéza L-lysinu na nestandardních zdrojích dusíku u kmene *Corynebacterium glutamicum* 10-20/60

Zdroj dusíku (20 % obj. hydrolyzátu)	Produkce L-lysinu g .l ⁻¹ média/96 h
arašídová mouka (kontrolní postup)	40,8
řepkový šrot	44,2
lněný šrot	43,3
bavlníkový šrot	36,3

Tabulka 2. Závislost produkce L-lysinu na koncentraci hydrolyzátu lněného šrotu ve fermentačním médiu

Koncentrace hydrolyzátu [% obj.]	Produkce L-lysinu g .l ⁻¹ média/96 h
30 %	44,8
25 %	46,0
20 %	40,3
15 %	32,2

Tabulka 3. Biosyntéza L-lysinu u kmene *Corynebacterium glutamicum* 10-20/60 na fermentačním médiu s Na-acetátem a nestandardními zdroji dusíku

Zdroje dusíku (15 % obj. hydrolyzátu)	Produkce L-lysinu g .l ⁻¹ média/96 h
arašídová mouka (kontrola)	20,5
bavlníkový šrot	17,5
řepkový šrot	22,0
lněný šrot	17,0

podobně jako stejná koncentrace pro hydrolyzát arašídové mouky (tabulka 1). Závislost produkce L-lysinu na různých koncentracích hydrolyzátu lněného šrotu ukazuje tabulka 2.

Dále byla sledována problematika biosyntézy L-lysinu u kmene 10-20/60 na fermentačním médiu s octanem sodným jako hlavním zdrojem uhlíku a hydrolyzátech nestandardních surovin aplikovaných v množství 15 % obj. do fermentačních médií. Složení kultivačních médií, dále acetátové směsi a její dávkování, úprava pH v průběhu kultivace byly již popsány dříve [7]. Produkce lysinu u kmene *Corynebacterium glutamicum* na bázi acetátu

je uvedena v tabulce 3. Jako optimální zdroj dusíku se ukázal hydrolyzát řepkového šrotu; produkce lysinu na dalších hydrolyzátech jsou relativně nižší.

U uvedeného testovaného kmene byla dále zjištěna snížená citlivost na přítomnost vyšších koncentrací acétátu ve fermentačním médiu na rozdíl od produkčních kmenů *Brevibacterium flavum*, které se vyznačují za těchto podmínek kultivace sníženou hladinou produkce aminokyseliny. Při aplikaci 6 % octanu sodného na počátku fermentace dosahuje produkce lysinu u kmene 10-20/60 kolem 30 g.l⁻¹ média za 96 hodin kultivace, jak ukazuje tabulka 4.

Tabulka 4. Závislost produkce L-lysinu na iniciační koncentraci Na-acetátu ve fermentačním médiu

Koncentrace Na-acetátu (% hm.)	Produkce L-lysinu g.l ⁻¹ média/96 h
2 %	21,2
4 %	24,9
6 %	30,0

Uvedené výsledky experimentů s produkčním kmenem *Corynebacterium glutamicum* 10-20/60 ukazují na jeho významné vlastnosti a schopnosti biosyntézy lysinu jak na klasických tak i nestandardních zdrojích uhlíku a dusíku při dosažení relativně vysokých výtěžků této základní esenciální aminokyseliny.

Literatura

- [1] ZAJCEVA, Z., M.: Uspechi mikrobiologii, **11**, 1978, s. 159
- [2] NSR patent. spis č. 2 321 461, 1973
- [3] USA patent. spis č. 3 595 751, 1972
- [4] SMÉKAL, F., BULANT, V., KINDLOVÁ, E., MAZALOVÁ, M., ULBERT, S.: Kvas. prům., **28**, 1982, s. 39
- [5] BULANT, V., BULANTOVÁ, H., SMÉKAL, F.: Proceed. „Heyrovský Memorial Congress on Polarography“ Part II, Praha 1980, s. 26
- [6] SMÉKAL, F., BARTA, M., BULANT, V., ULBERT, S.: Kvas. prům., **30**, 1984, s. 133
- [7] PELECHOVÁ, J., SMÉKAL, F., KOURA, V., KRUPMHANZL, V.: Fol. Microbiol., **25**, 1980, s. 341.

Smékal, F. - Ždanova, N. I., Leonova, T. V.: Biosyntéza L-lysinu u kmene *Corynebacterium glutamicum* 10-20/60. Nestandardní zdroje dusíku. Kvas. prům. **31**, 1985, č. 2, s. 37-38.

Produkční kmen *Corynebacterium glutamicum* 10-20/60 syntetizuje na fermentačním médiu se sacharosou a ne-

standardními zdroji dusíku (hydrolyzáty řepkového, lněného a bavlníkového šrotu) 36-44 g L-lysinu/l kultivačního média. Při aplikaci kyseliny octové jako zdroje uhlíku se dosahuje produkce mezi 22-30 g L-lysinu/l média. Experimenty byly prováděny v laboratorním měřítku v baňkách na rotační třepačce při 29 °C po dobu 96 hodin fermentace.

Смекал, Ф., Жданова, Н. И., Леонова, Т. В.: Биосинтез Л-лизина штаммом *Corynebacterium glutamicum* 10-20/60. Нестандартные источники азота. Квас. прум. **31**, 1985, № 2, стр. 37-38.

Штамм *Corynebacterium glutamicum* 10-20/60 синтезирует в среде с сахарозой и нестандартными источниками азота (гидролизаты рапсового, льняного и хлопкового помола) 36-44 г Л-лизина/л культивирующей среды. При применении уксусной кислоты в качестве источника углерода достигается выход 22-30 г Л-лизина/л среды. Эксперименты проводились в лабораторном масштабе с применением колб с ротационным взбалтыванием при 29 °C в течение 96 часов ферментации.

Smékal, F. - Ždanova, N. I. - Leonova, T. V.: L-Lysine Biosynthesis with the Strain *Corynebacterium glutamicum* 10-20/60. Non-Standard Nitrogen Sources. Kvas. prům. **31**, 1985, No. 2, pp. 37-38.

The production strain *Corynebacterium glutamicum* 10-20/60 produces from 36 to 44 g of L-Lysine per 1 litre of the medium containing saccharose and non-standard nitrogen sources such as are hydrolysates of rape, flax and cotton-plant grists. If acetic acid as the carbon source is used the production from 22 to 30 g of L-Lysine per 1 litre of the medium is achieved. Experiments on the laboratory scale were performed in flasks on a rotary shaker at 29 °C for 96 hours of fermentation.

Smékal, F.- Ždanova, N. I. - Leonova, T. V.: Biosynthese des L-Lysins bei dem Stamm *Corynebacterium glutamicum* 10-20/60. Nicht übliche Stickstoffquellen. Kvas. prům. **31**, 1985, Nr. 2, S. 37-38.

Der Produktionsstamm *Corynebacterium glutamicum* 10-20/60 synthetisiert auf Fermentationsmedium mit Saccharose und nicht üblichen Stickstoffquellen (Hydrolysate des Raps-, Lein- und Baumwollschrots) 36-44 g L-Lysin/l Kultivationsmedium. Bei Applikation der Essigsäure als Kohlenstoffquelle werden Produktionswerte zwischen 22 und 30 g L-Lysin/l Medium erzielt. Die Experimente wurden im Laborausmaß in Kolben auf dem Rotations-Schüttelapparat bei 29 °C und bei einer Fermentationsdauer von 96 Stunden durchgeführt.