

# Fermentační příprava aminokyselin

RNDr. JIŘÍ PLACHÝ, CSC., Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

**Klíčová slova:** výroba aminokyselin, fermentační příprava, produkční organismy, mechanismy nadprodukce, zdroje uhlíku, vzdušnění, výroba v ČSSR a zahraničí, využití aminokyselin

Aminokyseliny se v současné době připravují extrakcí z bílkovinných hydrolyzátů, chemickou syntézou a mikrobiologickými metodami. Zpočátku se aminokyseliny získávaly výlučně extrakcí z hydrolyzátů rostlinných bílkovin (pšeničný glutén, bílkoviny sóji), dnes se takto připravuje pouze cystein a tyrosin. Se vzrůstající potřebou aminokyselin byly vyvinuty postupy chemické syntézy, kterými se získávají DL-aminokyseliny, které je nutno rozštěpit na biologicky účinné L-isomery, asimilovatelné mikroorganismy. Synteticky se vyrábí glycin, methionin a aromatické aminokyseliny. Od konce padesátých let se rozvíjejí mikrobiologické metody přípravy aminokyselin, zahrnující enzymové, prekursorové a fermentační postupy, kterými se v současné době připravuje většina aminokyselin. Vhodné substráty, do médií přidávané prekursorů nebo relativně jednoduché a laciné zdroje uhlíku a dusíku, použité jako složky médií, se přeměňují mikrobiálními enzymy nebo metabolickou činností mikroorganismů na aminokyseliny (Yamada et al., 1972; Soda et al., 1983). O způsobech výroby jednotlivých aminokyselin informuje tab. 1.

I když jsou aminokyseliny hromaděny baktériemi, aktinomycetami, kvasinkami a houbami, jsou nejvhodnějšími producenty z hlediska průmyslové přípravy pouze bakterie, a to především jejich mutanty, neboť jen několik aminokyselin (glutamová kyselina, alanin, valin) je ve větších množstvích hromaděno kmeny bakterií izolovanými z přirozených materiálů. Z mutant bakterií se při fermentační přípravě aminokyselin uplatnily mutanty auxotrofní, regulační a auxotrofně-regulační, vykazující kromě růstové dependence — především na aminokyseliny — také rezistenci k analogům aminokyselin, tj. látkám strukturně podobným aminokyselinám, které inhibují růst výchozích bakteriálních kmenů. Kromě mutant izolovaných tradičními metodami mutace a selekce začínají se při fermentační přípravě aminokyselin uplatňovat v poslední době také mutanty získané aplikací postupů využívajících transdukce a metod genového inženýrství. Některé z představitelů jednotlivých skupin produkčních mutantů uvádí tab. 2 (Plachý, 1984).

Co se týče nadprodukce aminokyselin mutantami, důležitou roli hrají mechanismy regulace biosyntéz a permeabilitní bariéra. Z regulačních mechanismů se při biosyntéze aminokyselin uplatňují hlavně feedbacková regulace, projevující se inhibicí aktivity enzymu nebo

represe tvorby enzymu konečnými produkty biosyntézy. Nadprodukcí lze navodit eliminaci regulačních mechanismů, a to fyziologicky nebo geneticky, buď snížením koncentrace konečného produktu nebo desenzitizací a dereprese enzymů podléhajících feedbackové regulaci.

Tabulka 2. Producenti aminokyselin

Producent	Charakteristika	Amino-kyselina	Citace
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Divoký kmen	Glutamová kyselina	Kinoshita et al. (1957)
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Auxotrofní mutanta (homoserin)	Lysin	Nakayama et al. (1961)
<i>Brevibacterium flavum</i>	Regulační mutanta (AHV <sup>R</sup> )	Threonin	Shiio a Nakamori (1970)
<i>Brevibacterium flavum</i>	Auxotrofně-regulační mutanta (TA <sup>R</sup> , guanin-)	Arginin	Kubota et al. (1973)
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Mnohonásobná auxotrofně-regulační mutanta (5MT <sup>R</sup> , 4MT <sup>R</sup> , 6FT <sup>R</sup> , TrpHX <sup>R</sup> , PFP <sup>R</sup> , PAP <sup>R</sup> , TyrHX <sup>R</sup> , PheHX <sup>R</sup> , Phe-, Tyr-)	Tryptofan	Hagino a Nakayama (1975)

FT-fluortryptofan, MT-methyltryptofan, PAP-p-aminofenylalanin, PFP-p-fluorfenylalanin, Phe-fenylalanin, PheHX-hydroxamát fenylalaninu, TA-thiazolalanin, TrpHX-hydroxamát tryptofanu, Tyr-tyrosin, TyrHX-hydroxamát tyrosinu, AHV<sup>R</sup> -α-amino-β-hydroxyvalerová kyselina

K dosažení vysokých výtěžků při fermentační přípravě aminokyselin je nutno také ovlivnit permeabilitní bariéru tak, aby se zvýšila akumulace aminokyselin v prostředí, a to zvýšením propustnosti buněčné membrány a stěny pro aminokyseliny syntetizované v bakteriální buňce (Elander a Demain, 1981; Soda et al. 1983).

Při fermentační přípravě aminokyselin je produkční organismus submerzně kultivován v médiu optimálního složení, s vhodným zdrojem uhlíku, dusíku a s minerálními solemi, za optimálních kultivačních podmínek, tj. při optimálním pH, teplotě a za optimálních podmínek vzdušnění a míchání. Po proběhnutí fermentace se aminokyselina z kultivační tekutiny získává izolací a čištěním, s cílem oddělit aminokyselinu z kultivační tekutiny s maximální výtěžností a dosáhnout u takto separované aminokyseliny nejvyšší možné čistoty. K izolaci a čištění se nejčastěji používají iontoměnné pryskyřice. Jako příklad fermentační přípravy aminokyselin může sloužit schéma výroby lysinu, znázorněné na obr. 1 (Plachý, 1981).

Z hlediska důležitosti jednotlivých složek médií hrají při fermentační přípravě aminokyselin významnou roli zdroje uhlíku, a to nejen proto, že především z nich je syntetizována uhlíková kostra aminokyselin, ale také

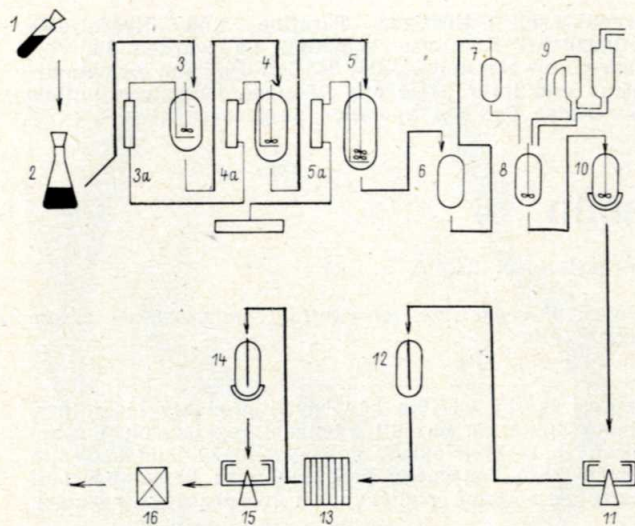
Tabulka 1. Metody přípravy aminokyselin

Metoda	Aminokyselina
Extrakce z bílkovinných hydrolyzátů Chemická syntéza	cystein, leucin, tyrosin alanin <sup>1)</sup> , asparagin, fenylalanin, glycin, methionin, threonin, tryptofan, valin
Mikrobiologické metody Enzymový postup	alanin <sup>2)</sup> , asparagová kyselina <sup>3)</sup> , lysin, tryptofan
Prekursorový postup Fermentační postup	serin arginin, fenylalanin, glutamová kyselina, glutamin, histidin, isoleucin, leucin, lysin, prolin, threonin, valin

1) DL-alanin

2) L-alanin





Obr. 1. Schéma výroby L-lysinhydrochloridu

1 — kultura na šikmém agaru, 2 — inokulum, 3 — 1. očkovací tank, 4 — 2. očkovací tank, 5 — fermentační tank, 3a, 4a, 5a — vzdušné filtry, 6 — zásobní nádrž, 7 — sloupce ionomenných pryskyřic, 8 — zásobní nádrž pro eluát, 9 — vakuová odparka, 10 — 1. krystalizátor, 11 — separátor, 12 — nádrž pro rozpouštědla, 13 — filtr, 14 — 2. krystalizátor, 15 — separátor, 16 — sušička

proto, že jejich dostupnost a cena rozhodují o rentabilitě výroby. Jako zdroje uhlíku se používají glukosa, sacharosa, melasa a octová kyselina. V minulosti se využívaly také uhlovodíky a ethanol, jako perspektivní uhlíkové zdroje se jeví methanol a hydrolyzáty lignocelulosových odpadů (Pelechová et al., 1981). V tabulce 3 jsou pro ilustraci uvedeny příklady produkci dosažených při aplikaci jednotlivých zdrojů uhlíku.

Tabulka 3. Produkce aminokyselin v médiích s různými zdroji uhlíku

Zdroj uhlíku	Amino-kyselina	Produkce [g.l <sup>-1</sup> ]	Citace
Sacharosa	Lysin	65	Čs. pat., 1985
Alkany	Glutamová kyselina	84	Kobayashi et al. (1972)
Ethanol	Lysin	66	Západoněmecký pat. (1973)
Octová kyselina	Lysin	93	Západoněmecký pat. (1972)
Hydrolyzáty dřeva	Lysin	25	Směkal et al. (1980)

I když výzkum fermentační přípravy aminokyselin doznal v minulých 25 letech značných úspěchů, byly tyto úspěchy dosaženy především díky intenzivnímu studiu genetiky produkčních organismů. Relativně méně pozornosti se věnovalo takové problematice, jako je vliv vzdušného na tvorbu aminokyselin, a to přesto, že příprava aminokyselin fermentací je proces po výtce aerobní, při němž se spotřebovává značné množství kyslíku. Podle závislosti výše produkce na množství dodaného kyslíku lze fermentace aminokyselin rozdělit do 3 skupin, lišících se stupněm inhibice nebo stimulační produkce aminokyselin vlivem kyslíku. Do první skupiny jsou řazeny arginin, glutamová kyselina a prolin, do druhé isoleucin, lysin a threonin a do třetí leucin, valin a fenylalanin (Hirose a Shibai, 1981). Zatímco tvorba glutamové kyseliny je silně inhibována nedostatkem kyslíku, byla u leucinu zaznamenána maximální produkce při snížené dodávce kyslíku, což souvisí s počtem molekul NADH<sub>2</sub> tvořených z 1 molu glukosy při její metabolické přeměně na aminokyselinu. Při biosyntéze glutamové kyseliny se tvoří 6 molů NADH<sub>2</sub> (ve srovnání s 2 moly při biosyntéze leucinu); je tedy množství kyslíku potřebné k reoxida-

Tabulka 4. Výroba aminokyselin

Aminokyselina	Roční objem výroby <sup>1)</sup>	Cena <sup>2)</sup>	Výrobce
Alanin <sup>3)</sup>	II	A, B	Ajinomoto, Tanabe
Arginin	II	B	Ajinomoto, Kyowa
Asparagová kyselina	II	A	Ajinomoto, Tanabe
Asparagin	III	B	Ajinomoto, Tanabe
Cystein	II	D	Ajinomoto, Kyowa
Fenylalanin	II	C	Ajinomoto, Tanabe
Glutamová kyselina	I	A	Ajinomoto, Kyowa
Glutamin	III	D	Ajinomoto, Kyowa
Glycin	II	A	Ajinomoto, Kyowa
Histidin	II	D	Ajinomoto, Tanabe
Isoleucin	II	D	Ajinomoto, Kyowa, Tanabe
Leucin	II	B	Ajinomoto, Kyowa
Lysin	I	A	Ajinomoto, Kyowa, Toray <sup>4)</sup>
Methionin	I	A	Degussa, Ajinomoto, Rhône-Poulenc
Prolin	II	C	Ajinomoto, Tanabe
Serin	III	D	Ajinomoto, Kyowa, Tanabe
Threonin	II	C	Ajinomoto, Kyowa
Tryptofan	II	D	Ajinomoto, Tanabe
Tyrosin	III	B	Ajinomoto, Kyowa, Tanabe
Valin	II	B	Ajinomoto, Tanabe

1) Roční produkce v tunách: I - 10 000—100 000, II - 100—1 000, III - 50

2) Cena v \$/kg: A - 5—10, B - 10—50, C - 50—100, D - 100—500; ceny k r. 1983

3) DL-alanin a L-alanin

4) Toray je japonská firma, která vyrábí lysin z DL- $\alpha$ -amino- $\epsilon$ -kaprolatamu kombinovanou metodou chemické syntézy a enzymového postupu

ci NADH<sub>2</sub> při biosyntéze glutamové kyseliny vyšší než u leucinu a fermentace glutamové kyseliny je k nedostatku kyslíku citlivější (Hirose a Okada, 1979).

Aminokyseliny lze rozdělit do 3 skupin podle ročního objemu výroby a do 4 skupin podle výrobní ceny (tab. 4). Hlavním výrobcem aminokyselin v celosvětovém měřítku je Japonsko, především firmy Ajinomoto Co., Kyowa Hakkō Kogyo a Tanabe Seiyaku Co. Z aminokyselin je mimo Japonsko ve větším množství vyráběn pouze DL-methionin, a to západoněmeckou Degussou a francouzskou firmou Rhône-Poulenc AEC SA. V socialistických zemích se vyrábí především lysin, a to v Československu, které bylo druhou zemí na světě, která vyvinula a zavedla do výroby fermentační technologii lysinu, dále v Sovětském svazu, Bulharsku a Rumunsku (Plachý, 1981).

V současné době se aminokyseliny využívají v potra-

Tabulka 5. Využití aminokyselin

Odvětví	Aplikace	Aminokyselina
Krmivářství	Obohacování krmivových směsí	Methionin, lysin
Potravinářství	Obohacování potravy Zlepšení chuti potravy Sladidla	Lysin, methionin Glutamová kyselina Glycin, alanin, asparagová kyselina a fenylalanin <sup>1)</sup>
Medicína	Therapeutická aplikace Infúzní roztoky Syntéza peptidů a vitamínů	Arginin, tryptofan, DOPA <sup>2)</sup> Esenciální i neesenciální aminokyseliny
Chemický průmysl	Povrchově aktivní látky a detergenty Polymery: umělá vlákna syntetická kůže	Acylaminokyseliny Polyaminokyseliny Poly-L-alanin Poly- $\gamma$ -glutamová kyselina

1) Asparagová kyselina a fenylalanin jsou využívány při syntéze dipeptidu [L-aspartyl-L-fenylalanin methylester], který je pod obchodním označením Aspartam využíván jako sladidlo 150krát sladší než cukr

2) 3,4-dihydroxyfenylalanin



vinářství, krmivářství a v medicíně (tab. 5) a rýsují se i další možnosti jejich využití — např. v chemickém průmyslu [Kaneko *et al.*, 1974; Izumi *et al.*, 1978; Soda *et al.*, 1983].

### Literatura

- [1] ELANDER, R. P., DEMAIN, A. L.: V „Biotechnology“ (H.-J. Rehm, G. Reeds, eds.), vol. 1, Verlag Chemie, Weinheim, 1981, s. 238
- [2] HAGINO, H., NAKAYAMA, K.: Agric. Biol. Chem. **39**, 1975, s. 343
- [3] HIROSE, Y., OKADA, H.: V „Microbial technology“ (H.-J. Pepper, D. Perlman, eds.), vol. 2, 2nd edn., Academic Press, New York-San Francisco-London, 1979, s. 211
- [4] HIROSE, Y., SHIBAI, H.: Adv. Biochem. **1**, 1981, s. 329
- [5] IZUMI, Y., CHIBATA, I., ITOH, T.: Angew. Chem. **17**, 1978, s. 178
- [6] KANEKO, T., IZUMI, I., CHIBATA, I., ITOH, T. (eds.): „Synthetic production and utilization of amino acids“, Kodansha, Tokyo; J. Wiley and Sons, New York-London-Sydney-Toronto, 1974
- [7] KINOSHITA, S., UDAKA, S., SHIMONO, M.: J. Gen. Appl. Microbiol. **3**, 1957, s. 193
- [8] KOBAYASHI, K., IKEDA, S., HISHINUMA, K., HIROSE, Y., OKADA, H.: Agric. Biol. Chem. **36**, 1972, s. 961
- [9] KUBOTA, K., ONODA, T., KAMIJO, H., YOSHINAGA, F., OKUMURA, S.: J. Gen. Appl. Microbiol. **19**, 1973, s. 339
- [10] NAKAYAMA, K., KITADA, S., KINOSHITA, S.: J. Gen. Appl. Microbiol. **7**, 1961, s. 41
- [11] PELECHOVÁ, J., PLACHÝ, J., SMĚKAL, F.: Kvas. prům. **27**, 1981, s. 64
- [12] PLACHÝ, J.: Biol. listy **46**, 1981, s. 181
- [13] PLACHÝ, J.: V „Modern biotechnology“ (V. Krumphanzl, Z. Řeháček, eds.), vol. 2, Institute of Microbiology, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, 1984
- [14] SHIIO, I., NAKAMORI, S.: Agric. Biol. Chem. **34**, 1970, s. 448
- [15] SMĚKAL, F., PELECHOVÁ, J., KRUMPHANZL, V.: Kvas. prům. **26**, 1980, s. 200
- [16] SODA, K., TANAKA, H., ESAKI, N.: V „Biotechnology“ (H.-J. Rehm, G. Reeds, eds.), vol. 3, Verlag Chemie, Weinheim, 1983
- [17] YAMADA, K., KINOSHITA, S., TSUNODA, T., AIDA, K. (eds.): „The microbial production of amino acids“, Kodansha, Tokyo; J. Wiley and Sons, New York-London-Sydney-Toronto, 1972
- [18] Čs. patent 198 053, 1982
- [19] Čs. patent 240 712, 1985
- [20] Západoněm. patent 2, 100 159, 1972
- [21] Západoněm. patent 2, 321 461, 1973

**Plachý, J.: Fermentační příprava aminokyselin.** Kvas. prům., **32**, 1986, č. 11, s. 265—267.

V přehledném článku je pojednáno o využití a výrobě aminokyselin, především o fermentační výrobě, a to z hlediska produkčních organismů, mechanismů nadprodukce, zdrojů uhlíku a vzdušnění. Stručně je charakterizován stav výroby aminokyselin u nás a v zahraničí.

**Плахи, Ю.: Приготовление аминокислот ферментативным путём.** Квас. прум. **32**, 1986, № 11, стр. 265—267.

V обзорной статье речь идет о использовании и производстве аминокислот, прежде всего о приготовлении аминокислот ферментативным путем, главным образом из точки зрения штаммов-продуцентов, механизмов сверхсинтеза, источников углерода и аэрации. Сжато характеризуется ситуация производства аминокислот в Чехословакии и за границей.

**Plachý, J.: Preparation of Amino Acids by Fermentation.** Kvas. prům., **32**, 1986., No. 11, pp. 265—267.

The review deals with an application and a production of amino acids, especially with a preparation of amino acids by fermentation, from the point of view of producing strains, mechanisms of overproduction, sources of carbon and an aeration. The production of amino acids in Czechoslovakia and abroad is shortly characterized.

**Plachý, J.: Die fermentative Herstellung von Aminosäuren.** Kvas. prům., **32**, 1986, Nr. 11, s. 265—267.

Dieser übersichtliche Artikel wird einer Verwertung und einer Herstellung von Aminosäuren gewidmet, in erster Reihe einer fermentative Herstellung, u. z. von dem Standpunkt von Produktionsorganismen, Mechanismen der Überproduktion, Kohlenstoffquelle und Aeration. Die Produktion von Aminosäuren in der Tschechoslowakei und im Ausland wird kurz charakterisiert.