

Biochemické a produkční vlastnosti kmenů *Corynebacterium glutamicum*

579 663

RNDr. FRANTIŠEK SMĚKAL, CSc., Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy, Ing. JANA PELECHOVÁ, CSc., Ing. EVA SIRŮČKOVÁ, Vysoká škola chemickotechnologická, Praha, Dr. N. ŽDANOVA, DrSc., Dr. T. LEONOVA, CSc., VNII - genetika, Moskva

Klíčová slova: prototrofní kmeny *Corynebacterium glutamicum*, L-lysin, hydrolyzát smrkových pilin, hydrolyzát škrobu, melasa, cukerná šťáva

ÚVOD

Regulační mutanty *Corynebacterium glutamicum* představují významnou skupinu producentů esenciální aminokyseliny L-lysinu; jejich výhodou jsou minimální nutriční požadavky, a to především na dusíkaté zdroje. Tyto mutantní kmeny produkují L-lysin na semisyntetických fermentačních médiích a nevyžadují k růstu komplexní hydrolyzáty bílkovinných substrátů, které jsou nezbytné pro auxotrofní nebo auxotrofně-regulační mutanty *Corynebacterium glutamicum* nebo *Brevibacterium flavum*. Tyto kmeny je možno z hlediska nutričních požadavků považovat za prototrofní bakterie schopné využívat k růstu dusíkaté anorganické soli standardně používané pro fermentační účely [1]. V práci byla sledována biochemická aktivita uvedených produkčních kmenů na různých zdrojích uhlíku a dusíku a dále biosyntéza L-lysinu v laboratorním měřítku.

MATERIÁL A METODY

MIKROORGANISMY

Pro pokusy byly použity mutanty kmene *Corynebacterium glutamicum*, a to *C. glutamicum* AEC^r, HXL^r (dále označována jako dvojnásobná mutanta) a *C. glutamicum* AEC^r, HXL^r, AHV^r, Str^r, rif^r (dále označována jako vícenásobná mutanta) Kmeny byly získány ve spolupráci se Vsesvazovým ústavem genetiky v Moskvě. Kmeny jsou uchovávány na masopeptonových šikmých agarrech při teplotě +4 °C a přeočkovávány každých dvacet dnů.

Vysvětlivky: r = rezistence na analogy, AEC^r = S-aminoethyl-L-cystein^r, HXL^r = L-lysin-hydroxomát^r, AHV^r = amino-hydroxyvalerová kyselina^r, Str^r = streptomycin^r, rif^r = rifamycin.

KULTIVAČNÍ PŮDY

Standardní a nestandardní zdroj uhlíku

Enzymový hydrolyzát škrobu. Bramborový škrob (z n. p. Škrobárny, Havlíčkův Brod) byl rozpuštěn v destilované vodě a ponechán zmasovatění na vodní lázni při teplotě 70 °C. Po rozmíchání a přidavku 0,5 g diastafonu v destilované vodě (preparát obsahující amylasy), probíhalo štěpení při teplotě 65 až 70 °C po dobu 20 minut za občasného míchání; inaktivace enzymů byla uskutečněna zvýšením teploty na bod varu po dobu 5 minut. Obsah a zastoupení jednotlivých sacharidů v roztoku bylo zjištěno kapalinovou chromatografií (tabulka 1).

Hydrolyzát smrkových pilin. Hydrolyzát byl připraven ve spolupráci s katedrou organické technologie VŠCHT, a to zředěnou kyselinou chlorovodíkovou [2, 3]. Před použitím do fermentační půdy musel být upraven nejprve několikrát opakovanou extrakcí ethylacetátem; do ethylacetátu přecházejí některé potenciální inhibitory růstu mikroorganismů, jako jsou fenoly, lignany a také částečně 2-furankarbaldehyd. Ethylacetát byl pak vakuově oddestilován. Hydrolyzát smrkových pilin byl dále, po úpravě pH pevným CaCO₃ na hodnotu 6,5–6,8, zfiltrován a vakuově zahuštěn tak, aby koncentrace redukujících látek byla přibližně 10 % hm, a koncentrace zbývajícího 2-furankarbaldehydu nižší než 0,03 % hm. K takto upravenému hydrolyzátu byly pak přidány potřebné živné soli a kukuřičný extrakt a upraveno pH na 7,0.

Tabulka 1. Obsah sacharidů v hydrolyzátu bramborového škrobu (mg . ml⁻¹)

D — maltosa	31,7
D — glukosa	8,0
D — fruktosa	0,3

Tabulka 2. Složení jednotlivých monosacharidů v hydrolyzátu smrkových pilin (mg . ml⁻¹)

D — glukosa	5,9
D — xylosa	5,4
D — galaktosaa	5,0
L — arabinosa	14,2
D — mannosaa	16,9

Surová cukerná šťáva, tzv. těžká šťáva, představující meziprodukt při výrobě cukru (cukrovar Kostelec nad Labem) měla obsah redukujících látek 75 % hm.

Řepná melasa. K pokusům byla k dispozici melasa z cukrovaru Mělník, u které byly stanoveny tyto hodnoty: 49,9 % hm. redukující látky, sušina 60 % hm., aminodusík 2,6 % hm., minerální dusík 0,41 % hm.

Složení inokulační půdy: octan sodný krystalický 50 g, sacharosa technická 20 g, kukuřičný extrakt (60 % hm. sušiny) 30 g, doplněno na objem 1000 ml destilovanou vodou.

Složení fermentačních půd je uvedeno v tabulce 3.

Kultivační technika. Kultivace byly prováděny v 500 ml varných baňkách plněných v případě inokulační půdy 50 ml, resp. 20 ml fermentační půdy. U všech uvedených

Tabulka 3. Složení fermentačních půd (g/1000 ml)

Označení půdy	Zdroj uhlíku	Kukuřičný extrakt (60 % hm. sušiny)	(NH ₄) ₂ SO ₄	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	CaCO ₃
F ₁	hydrolyzát škrobu (900 ml)	10	25	1	0,1	35
F ₂	melasa (150 g)	10	25	1	0,1	35
F ₃	cukerná šťáva (200 g)	5	25	1	0,1	35
F ₄	hydrolyzát smrkových pilin (800 ml)	5	25	1	0,1	35

médií bylo pH před sterilací upraveno 10% roztokem hydroxidu amonného na hodnotu 7,0. Sterilizace při tlaku 0,12 MPa trvala 30 minut. Kultivace probíhaly na rotační třepačce 3,7 s⁻¹ s výstředníkem 25 mm při teplotě 28 °C po dobu 24 až 96 hodin.

Baňky s fermentační půdou byly vždy zaočkovány 12,5 % obj. (tj. 2,5 ml) inokula starého 24 hodin. Od 24. hodiny kultivace bylo upravováno pH média v baňkách 10% roztokem hydroxidu amonného na hodnotu 7,0. Během fermentace byly ve 24hodinovém intervalu odebrány vzorky média, které se pak odštěďovaly při frekvenci 50 s⁻¹ po dobu 30 minut. Ve vzorcích byla zjišťována koncentrace L-lysinu, redukujících látek, biomasy a pH.

ANALYTICKÉ METODY

Stanovení biomasy. Vzorek o objemu 10 ml média byl 30 minut odstředěn při frekvenci 50 s⁻¹ v kalibrované kyvetě. Množství sedimentu bylo odečteno podle kalibrační křivky.

Stanovení redukujících látek. Metoda je založena na reakci 3,5-dinitrosalicylové kyseliny s redukujícími látkami [4].

Stanovení L-lysinu. Bylo prováděno oscilopolarograficky [5].

Stanovení sacharidů kapalinovou chromatografií [6].

Hydrolyzáty nestandardních zdrojů uhlíku obsahují kromě hexos, které jsou zastoupeny převážně glukosou, také pentosy, disacharidy a další organické látky, které mohou být využívány produkčním mikroorganismem pro růst a biosyntézu L-lysinu.

Hydrolyzát bramborového škrobu, připravený enzymovým štěpením amylasami, představuje zdroj uhlíku pro fermentační médium, které dále obsahovalo jako zdroj dusíku standardní množství kukuřičného extraktu a minerálního dusíku ve formě síranu amonného.

Hydrolyzáty lignocelulózových odpadů, připravené chemickou nebo enzymovou hydrolyzou, obsahují glukosu, mannosu, galaktosu, z pentos xylosu, arabinosu, ribosu, disacharidy, oligosacharidy a v nízké koncentraci také ketopentosy. Někteří autoři uvádějí, že produkční kmeny *Corynebacterium* a *Brevibacterium* využívají z těchto sacharidů přednostně glukosu a mannosu, z disacharidů pouze sacharosu a maltosu. Pentosy jsou využívány poměrně málo nebo vůbec ne [7, 8].

Další uhlíkatou surovinou, studovanou z hlediska vhodnosti náhradního zdroje uhlíku pro fermentaci L-lysinu, byla řepná melasa. Fermentační půda obsahovala 15 % hm. melasy, jako zdroje dusíku byl použit kukuřičný extrakt a minerální soli.

V následujících pokusech byla zjišťována produktivita mutantních kmenů na surové cukrové šťávě před krystalizací. Fermentační půda obsahovala 20 % hm. tohoto uhlíkatého zdroje; zdrojem dusíku byl opět kukuřičný extrakt a amonné soli.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Růst prototrofních kmenů *Corynebacterium glutamicum* byl testován na těchto substrátech: sacharose, maltose, laktose, cellobiose, hydrolyzátu škrobu a nativním škrobu. Zdrojem dusíku byl síran amonný. Kultivace byla prováděna na agarových plotnách po dobu 72 hodin při teplotě 28 °C. Z testovaných substrátů je velmi slabě využívána cellobiosa a škrob. Podobným způsobem byly testovány některé typy dusíkatých látek při aplikaci sacharosy jako zdroje uhlíku. Bylo prokázáno, že ze zdrojů dusíku nejsou využívány thiomocovina a guanidin. Souhrnné výsledky pokusů jsou uvedeny v tabulce 4a a 4b.

Z nestandardních zdrojů uhlíku byl u obou kmenů testován hydrolyzát škrobu v médiu, které obsahovalo 5 % hm. sacharosy a kromě toho 3,2 % hm. maltosu a 0,8 % hm. glukosy při celkovém obsahu redukujících látek 9,5 % hm. Pro oba prototrofní kmeny jsou charakteristické rozdílné produkční rychlosti a odpovídající konverze ve 24. hodině kultivace. Vyšší konverzi — kolem 35 % — se vyznačuje vícenásobná mutanta ve srovnání s dvojnásobnou mutantou s konverzí 30 %. Průběhy fermentace L-lysinu u obou prototrofních kmenů jsou uvedeny na obr. 1a a 1b.

Další surovinou pro testování L-lysinu u obou proto-

Tabulka 4a. Růst kmenů *Corynebacterium glutamicum* na agarových médiích s různými zdroji uhlíku

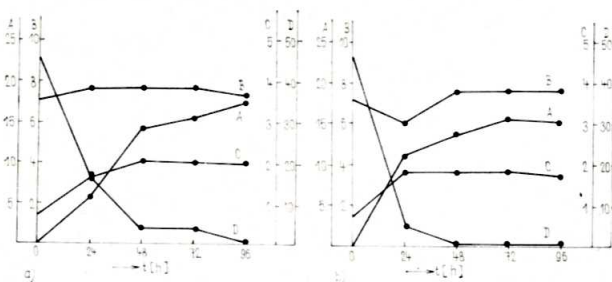
Zdroj uhlíku	Produkční kmen	
	vícenásobná mutanta	dvojnásobná mutanta
sacharosa	++	++
D-maltosa	++	++
D-laktosa	++	++
cellobiosa	+	+
škrob	+	+
hydrolyzát škrobu	++	++

Tabulka 4b. Růst kmenů *Corynebacterium glutamicum* na agarových médiích s různými zdroji dusíku

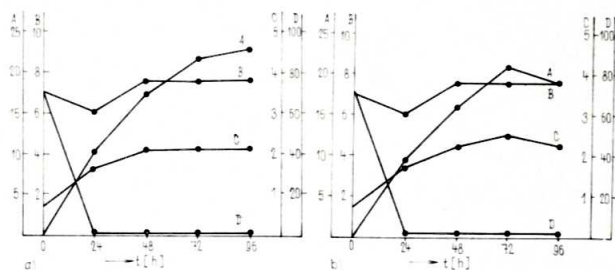
Zdroj dusíku	Produkční kmen	
	vícenásobná mutanta	dvojnásobná mutanta
síran amonný	++	++
močovina	++	++
thiomočovina	+	+
guanidin	—	—
kasein	++	++

— bez růstu
+ slabý růst
++ velmi dobrý růst

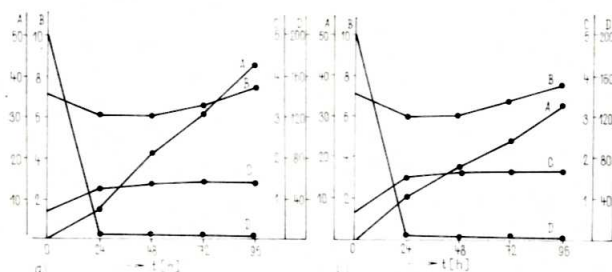
trofních kmenů byla řepná melasa (50 % hm. sacharisa-ce) s koncentrací 15 % hm. ve fermentačním médiu. Pro oba produkční kmeny je charakteristický vysoký nárůst biomasy ve 24. hodině kultivace s hodnotami mezi 16 až 18 % obj. U dvojnásobné mutanty se dosahuje produkce kolem 18 g.l⁻¹ L-lysinu, u vícenásobné mutanty až 22 g.l⁻¹ L-lysinu s konverzí mezi 29 až 32 %. Průběh fermentace L-lysinu v médiích s melasou je znázorněn obr. 2a a 2b.

Obr. 1a. Průběh fermentace L-lysinu u vícenásobné mutanty *Corynebacterium glutamicum* v médiu s hydrolyzátem škrobuObr. 1b. Průběh fermentace L-lysinu u dvojnásobné mutanty *Corynebacterium glutamicum* v médiu s hydrolyzátem škrobu.

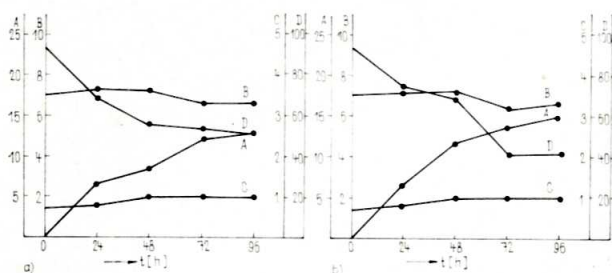
A — lysin (g.l⁻¹), B — pH, C — biomasa (% obj.), D — redukující látky (g.l⁻¹)

Obr. 2a. Průběh fermentace L-lysinu u vícenásobné mutanty *Corynebacterium glutamicum* v médiu s melasouObr. 2b. Průběh fermentace L-lysine u dvojnásobné mutanty *Corynebacterium glutamicum* v médiu s melasou. Legenda viz obr. 1

Podobně byla ověřována produkce L-lysinu u obou prototrofních kmenů na fermentačních médiích s obsahem 20 % hm. cukerné šťávy. U dvojnásobné mutanty *Corynebacterium glutamicum* bylo po 96 hodinách kultivace dosaženo produkce 33 g.l⁻¹ L-lysinu a u vícenásobné mutanty 42 g.l⁻¹ L-lysinu při dosažení konverze 22 až 28 %. Výsledky těchto pokusů jsou uvedeny na obr. 3a a 3b.

Obr. 3a. Průběh fermentace L-lysinu u vícenásobné mutanty *Corynebacterium glutamicum* v médiu s cukernou šťávouObr. 3b. Průběh fermentace L-lysinu u dvojnásobné mutanty *Corynebacterium glutamicum* v médiu s cukernou šťávou. Legenda viz obr. 1.

Dále byly provedeny ověřovací pokusy s fermentací L-lysinu u obou prototrofních kmenů v médiích, která obsahovala jako zdroj uhlíku hydrolyzáty smrkových pilin. Fermentační postup a kultivační podmínky byly stejné jako při testování skupiny auxotrofně-regulačních mutantů *Corynebacterium glutamicum* a *Brevibacterium flavum*, jak bylo popsáno v dřívějších procesech [9]. Fermentační médium obsahovalo kolem 5 % hm. redukujících látek, dále kukuřičný extrakt a minerální soli. U dvojnásobné mutanty je dosahováno za standardních podmínek fermentace produkce 12 g.l⁻¹ L-lysinu, u vícenásobné mutanty kolem 14 g.l⁻¹ L-lysinu s konverzí 22 až 26 %. Průběh fermentace L-lysinu u obou prototrofních kmenů je znázorněn na obr. 4a a 4b. Výsledky pokusů s prototrofními kmeny potvrzují dříve dosažené produkce lysinu na médiích s hydrolyzáty dřevní hmoty u auxotrofně-regulačních mutantů *Corynebacterium glutamicum* [10].

Obr. 4a. Průběh fermentace L-lysinu u dvojnásobné mutanty *Corynebacterium glutamicum* na hydrolyzátech smrkových pilin.Obr. 4b. Průběh fermentace L-lysinu u vícenásobné mutanty *Corynebacterium glutamicum* na hydrolyzátech smrkových pilin. Legenda viz obr. 1.

Studium biosyntézy L-lysinu u prototrofních kmenů *Corynebacterium glutamicum* potvrdilo možnost zjednodušení produkčních médií s vyloučením hydrolyzátů komplexních dusíkatých substrátů, které jsou jinak nutnou složkou médií u auxotrofně-regulačních producentů L-lysinu. Prototrofní kmeny *Corynebacterium* představují perspektivní skupinu producentů L-lysinu s předpokladem jejich využití ve výrobním měřítku.

Dokončení na str. 19

Literatura

- [1] SMĚKAL, F., ULBERT, S., BĀRTA, M.: Kvas. prům., **31**, 1985, s. 282.
- [2] BUK, V.: Diplomová práce, VŠCHT, Praha 1986.
- [3] NĚMEČKOVÁ, H.: Diplomová práce, VŠCHT, Praha 1985.
- [4] MILLER, G. R.: Analyt. Chem., **31**, 1959, s. 426.
- [5] Patent ČSSR, 118 188, 1966.
- [6] PELECHOVÁ, J., KRUMPHANZL, V., KADLEC, K., STANĚK, J., SO-KOLOV, T.: Kvas. prům., **25**, 1979, s. 56.
- [7] ZAJCEVA, Z. M.: Uspěchi mikrobiologii, **11**, 1976, s. 157.
- [8] SHIO, I., SANO, K.: J. Gen. Appl. Microbiol., **15**, 1971, s. 267.
- [9] PELECHOVÁ, J., SMĚKAL, F., BULANT, V.: Kvas. prům., **25**, 1979, s. 174.
- [10] SMĚKAL, F., PELECHOVÁ, J., KINDLOVÁ, E., KRUMPHANZL, V.: Kvas. prům., **26**, 1980, s. 200.

Lektoroval dr. Jiří Plachý

Směkal, F. — Pelechová, J. — Sirůčková, E. — Ždanova, N. — Leonova, T.: Biochemické a produkční vlastnosti kmenů *Corynebacterium glutamicum*. Kvas. prům. 34, 1988, č. 1, s. 12—19.

Prototrofní kmeny *Corynebacterium glutamicum* využívají řadu uhlíkatých a dusíkatých zdrojů v semisyntetických fermentačních médiích. Biosyntéza L-lysinu probíhá na nestandardních zdrojích uhlíku, jako hydrolyzátu škrobu, melase, cukerné šťávě a hydrolyzátech lignocelulózových materiálů.

U optimálních zdrojů uhlíku se dosahuje za 96 hodin kultivace 33 až 42 g L-lysinu v 1 litru média při stupni konverze 26 %.

Смекал, Ф. — Пелехова, Я. — Сиручкова, Е. — Жданова, Н. — Леонова, Т.: Биохимические и продуктивные свойства штаммов *Corynebacterium glutamicum*. Квас. прум. 34, 1988, № 1, стр. 12—19.

Прототрофные штаммы *Corynebacterium glutamicum* используют ряд углеродистых и азотистых источников

в семисинтетических ферментационных средах. Биосинтез Л-лизина протекает на нестандартных источниках углерода, как гидролизате крахмала, меласе, сахарном соке и гидролизатах лигноцеллюлозных материалов. В случае оптимальных источников углерода достигается в течение 96 часов культивирования 33–42 г Л-лизина в 1 литре среды при степени конверсии 26 %.

Směkal, F. — Pelechová, J. — Sirůčková, E. — Ždanova, N. — Leonova, T.: Biochemical and Production Properties of *Corynebacterium glutamicum* Strains. Kvas. prům. 34, 1988, No. 1, pp. 12—19.

Prototroph strains of *Corynebacterium glutamicum* utilize many of carbon- and nitrogen-sources from semisynthetic fermentation media. The L-lysine biosynthesis is also achieved on non-standard carbon sources such as are starch hydrolyzate, molasses, thick juice and hydrolyzates of lignocellulose. Using optimum carbon sources, the L-lysine concentration of 33–42 g.l⁻¹ with the conversion degree of 26 % during the 96 hours of the cultivation is achieved.

Směkal, F. — Pelechová, J. — Sirůčková, E. — Ždanova, N. — Leonova, T.: Biochemische und Produktionseigenschaften der Stämme *Corynebacterium glutamicum*. Kvas. prům. 34, 1988, Nr. 1, S. 12—19.

Die prototrophen Stämme *Corynebacterium glutamicum* nützen eine Reihe von Kohlenstoff und Stickstoffhaltigen Quellen in semisynthetischen Fermentationsmedien aus. Die Biosynthese des L-lysin verläuft auf nichtstandard Kohlenstoffquellen wie Stärkehydrolysat, Melasse, Zuckersaft, Hydrolysat von Lignozellulose-Materialien.

Bei den optimalen Kohlenstoffquellen wird nach 96 Stunden Kultivierung eine Ausbeute von 33 bis 42 g L-lysin in 1 Liter des Mediums bei einem Konversionsgrad von 26 % erzielt.