

# Fermentační příprava threoninu

RNDr. Jiří PLACHÝ a Ing. Ivan FILIPÍK, Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

**Klíčová slova:** *Escherichia coli*, fermentace threoninu, laboratorní měřítka

Krmivové cereální směsi pro výkrm monogastrických zvířat, doplněné lysinem a threoninem, se nejen vyrovnají výživovou hodnotou směsím obsahujícím živočišné bílkoviny, ale i snižují obsah dusíku v exkrementech prasat a tím i následně obsah dusičnanů v půdě. Proto problematice přípravy threoninu v množstvích dostatečných pro obohacování krmiv je věnována v poslední době zvýšená pozornost.

Threonin lze připravit biotechnologickými postupy, a to buď přeměnou homoserinu s využitím vhodných mikroorganismů nebo fermentační cestou s použitím mutantů, především bakterií, schopných v médiích s vhodným zdrojem uhlíku a dusíku hromadit tuto aminokyselinu v relativně vysokých množstvích. Takovými producenty jsou např. mutanty koryneformních bakterií rezistentní vůči analogu threoninu, tj. vůči  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxyvalerové kyselině (AHVr). Tyto mutanty však produkují threonin ve výrazně menších množstvích než kmen *Escherichia coli* [1], připravený s použitím metod genového inženýrství [2], umožňujících zvýšení genové doze zvýšením počtu kopií plazmidů, nesoucích threoninový operon.

S cílem vypracovat fermentační technologii přípravy L-threoninu byly v této práci zjišťovány optimální podmínky kultivace výše uvedeného kmene v laboratorním měřítka v baňkách a v laboratorních fermentačních tancích.

## MATERIÁL A METODY

**Mikroorganismus:** Kmen *Escherichia coli* 472 T-23 s amplifikovaným genem pro homoserindehydrogenasu, umožňujícím výrazné zvýšení aktivity tohoto klíčového enzymu biosyntézy threoninu a s rezistencí vůči penicilinu jako selektivním genetickým znakem.

**Média** (% hmot.): Adamsovo médium pro šikmé agary: sacharosa - 4,0,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  - 0,1,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 0,35,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,15,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,01, agar (Difco) - 2,0. Inokulační médium SIM-1: sacharosa - 4,0,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 1,0, Yeast extract (Difco) - 0,2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,1,  $\text{CaCO}_3$  - 1,5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,05. Produkční médium SPM-1: sacharosa - 8,0,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 2,5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,2,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,1,  $\text{CaCO}_3$  - 3,0,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,003,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  - 0,003. pH médií po sterilaci 7,0. Sterilizace při 120 °C, 30 min.

**Kultivace:** 10 ml média SPM-1 v 250-ml Erlenmeyerových baňkách bylo očkováno 10 % (obj.) 24hodinového inokula, vyrostlého v 20 ml média SIM-1 s 500 j./ml penicilinu G v 250-ml Erlenmeyerových baňkách. Zaočkované baňky s produkčním médiem byly inkubovány na rotační třepačce frekvence  $(220 \text{ min}^{-1})$  48 h při 37 °C.

5 l média ve 14 l fermentačním tanku (Chemap) bylo očkováno 1 % inokula starého 24 h. Podmínky kultivace: vzdušnění - 1 l vzduchu/1 l média/min; frekvence míchání -  $800 \text{ min}^{-1}$ , teplota - 37 °C, pH během kultivace udržováno na hodnotě 7,0.

**Analytické metody:** Threonin byl stanoven metodou chromatografie na tenké vrstvě (Silufol), doplněné denzitometrickým vyhodnocením a také na automatickém analyzátoru aminokyselin AAA 339 (Mikrotechna, ČSFR). Při sledování nárůstu byl stanoven objem vytvořené biomasy [3].

## VÝSLEDKY A DISKUSE

S cílem dosáhnout maximální produkce threoninu při zachování genetické stability produkčního kmene, což v případě kmenů připravených genovými manipulacemi vyvolává mnohdy obtíže, byly ověřovány takové parametry jako je nárůst a fyziologický stav producenta a podmínky jeho kultivace. V orientačních pokusech bylo zjištěno, že k dosažení tohoto cíle je třeba použít inokulum optimální kvality, tj. aplikovat buňky v exponenciální fázi růstu, obsahující 70-80 % plazmidů s threoninovým operonem, které jsou rezistentní vůči 500 j./ml penicilinu a během vlastní fermentace kultivační tekutinu intenzivně vzdušnit. Ze sledovaných parametrů ovlivňujících kvalitu inokula hraje ještě důležitou roli způsob konzervace a uchovávání producenta, jak o tom svědčí výsledky uvedené v tab. 1, dokumentující vliv lyofilizace a zmrazování v tekutém dusíku a uchovávání kmene pasážováním na šikmých agarech v měsíčních intervalech, na vyšší produkce threoninu.

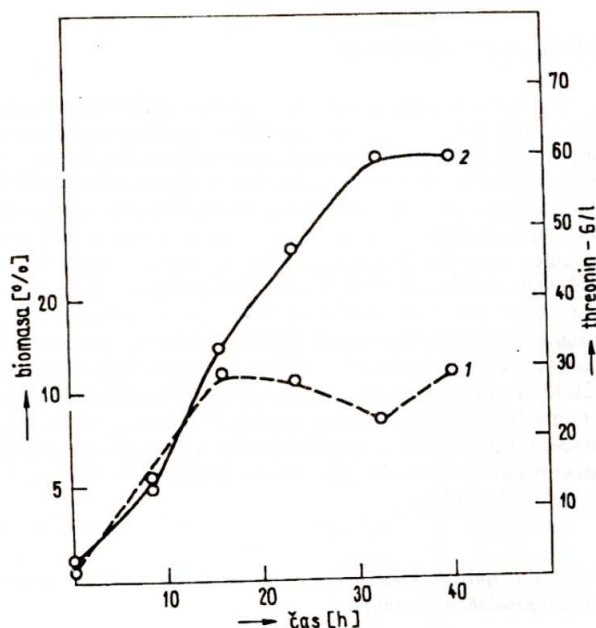
Tab. 1. Vliv způsobu konzervace a uchovávání produkčního kmene na vyšší produkce threoninu

Typ konzervace	Pasáž	Produkce - g/l	% kontroly
Lyofilizace	1	22,53	100,00
Zmrazení v tekutém dusíku	1	25,49	113,14
	2	24,60	109,37
	3	22,45	99,64
	4	6,40	28,41
	5	5,83	25,88

Jak je zřejmé z tabulky, dochází přeočkováním produkčního kmene na šikmé agary během pětiměsíčního období k postupnému poklesu produkce, který je zvláště výrazný mezi 3. a 4. pasáží (až asi o 70 %). Kmenu *E. coli* 472 T-23 zřejmě více vyhovuje konzervace zmrazením v tekutém dusíku než lyofilizace. Vyšší produkce threoninu po aplikaci tohoto způsobu konzervace možná souvisí se snížením počtu buněk bez plazmidů, který je důsledkem přenosu buněčné populace z nízkých do vysokých teplot, jak se o tom zmiňuje ve své přehledné práci Imanaka [4].

Z kultivačních podmínek uplatňujících se při vlastní fermentaci je nejdůležitějším parametrem dostatečné vzdušnění, což jen potvrzuje výsledky, které dosáhli *Akashi et. al.* [5] s mutanty koryneformních bakterií. Vliv vzdušnění byl sledován v 250 ml Erlenmeyerových baňkách s 1 a 3 zarážkami, plněných 10 a 20 ml produkčního média. O výsledcích pokusu informuje tab.2

Maximální produkce byla zaznamenána v baňkách se 3 zarážkami, plněnými 10 ml produkčního média - intenzivní vzdušnění je tedy nezbytné pro dosažení maxima produkce. Fermentace threoninu sice není tak citlivá na intenzitu vzdušnění jako je fermentace např. glutamové kyseliny, nicméně při fermentaci threoninu stejně jako lysinu je intenzivní vzdušnění potřebné nejen pro dobrý nárůst produkčního organismu, ale i pro vlastní biosyntézu threoninu, neboť během metabolické přeměny zdroje uhlíku na konečný produkt se uvolňuje dostatečný počet molekul NADH [6]. V souvislosti s tím se uplatňuje i optimální míchání podmiňující přenos kyslíku a ovlivňující koncentraci rozpuštěného kyslíku, jak o tom svědčí výsledky dosažené v laboratorním tanku při různých hodnotách koncentrace rozpuštěného kyslíku v médiu. Maximální produkce threoninu byla zaznamenána při koncentraci 4,5 mg O<sub>2</sub>/l.



Obr.1. Fermentace threoninu  
křivka 1 - biomasa  
křivka 2 - threonin

Tab.2. Vliv vzdušnění na produkci threoninu

Plnění baňek	Počet zarážek	Produkce - g/l	% kontroly
10 ml	-	20,00	100,00
20 ml	-	17,20	86,00
10 ml	1	14,02	70,10
10 ml	3	24,20	121,00

Bylo-li produkční médium zaočkováno inokulem optimální kvality a byla-li koncentrace rozpuštěného kyslíku během kultivace optimální, podařilo se dosáhnout v laboratorním fermentačním tanku s kmenem *E. coli* 472 T-23 po 40 h kultivace produkce 60 g/l (obr.1).

Tab.3. Vliv koncentrace rozpuštěného kyslíku na výši produkce threoninu

Koncentrace kyslíku (mg O <sub>2</sub> /l)	Produkce ve 40.h (g/l)	% kontroly
3,0	32,50	100,00
3,25	32,03	98,55
3,5	36,20	111,38
4,0	44,01	135,42
4,5	56,23	173,02

Ve srovnání s AHV<sup>r</sup>-mutantem druhu *Corynebacterium glutamicum* produkujícím threonin [7] bylo dosaženo s kmenem *E.coli* 472 T-23 výrazně vyšší produkce threoninu (8,5krát vyšší) za dobu dvojnásobně kratší, při čemž kultivační tekutina obsahovala jen stopová množství jiných aminokyselin. To výrazně ulehčilo izolaci threoninu z kultivační tekutiny a umožnilo připravit threonin nejen pro krmné účely, ale i čistý krystalický threonin využitelný jak v potravinářství, tak v medicínské oblasti.

## LITERATURA

- [1] HEGER,J.-PLACHÝ,J.: Biol.chem.Vet. **24**, 1988, s.541.
- [2] DEBABOV,V.G.: V I.Ikeda - O.Beppu (eds.): "Genetics of Industrial Microorganisms". Kodansha, Tokyo, 1982, s.254.
- [3] HILLIGER,M.-NITLSCHKE,C.: Z.Allg.Mikrobiol. **14**, 1974, s.183.
- [4] IMANAKA,T.: Biotech.Advs. **1**, 1983, s.279.
- [5] AKASHI,K.-SHIBAL,H.-HIROSE,Y.: Agric.Biol.Chem. **43**, 1979, s.1563.
- [6] HIROSE,Y.-SHIBAL,H.: Adv.Biotechnol. **1**, 1981, s.329.
- [7] PLACHÝ,J.: Kvas.prům., **32**, 1986, s.182.

Lektoroval Ing.F.Machek,CSc.

PLACHÝ,J.-FILIPÍK,I.: Fermentační příprava threoninu. Kvas.prům., **38**, 1992, č.12, s.359 - 360

Z faktorů ovlivňujících výši produkce L-threoninu zkonstruovaným kmenem *Escherichia coli* v laboratorním měřítku lze jmenovat kvalitu inokula a optimální koncentraci rozpuštěného kyslíku, dosaženou vhodným vzdušněním a mícháním.

Плахи, И. - Филиппик, И.: Ферментативное приготовление треонина. Квас. прум., **38**, 1992, № 12, стр. 359 - 360

Из факторов влияющих на уровень продукции L-треонина приготовленным штаммом *Escherichia coli* лабораторных условиях возможно привести качество посевного материала и оптимальную концентрацию растворенного кислорода, полученную подходящей аэрацией и перемешиванием.

PLACHÝ,J.-FILIPÍK,I.: A Fermentative Production of Threonine. Kvas.prům., **38**, 1992, No 12, pp. 359 - 360

A quality of inoculum and optimal concentration of dissolved oxygen, obtained by suitable aeration and stirring during a cultivation of a constructed strain *Escherichia coli* producing L-threonine represent important factors for the threonine preparation by fermentation in a laboratory scale.

PLACHÝ,J.-FILIPÍK,I.: Eine fermentative Herstellung von Threonin, Kvas.prům., **38**, 1992, Nr.12, S. 359 - 360

Die Qualität des Impfmateriails und die optimale Konzentration des gelösten Sauerstoffes, erreicht durch geeignete Belüftung und Rührung während der Kultivierung eines Stammes *Escherichia coli* produzierenden L-Threonin, sind wichtige Faktoren für die fermentative Herstellung dieser Aminosäure in einem Labormassstab.