

Dvoustupňová kontinuální biosyntéza L-lysinu

663.15:547.466.48

Ing. PETR PILÁT, CSc., RNDr. FRANTIŠKA PALEČKOVÁ, Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

Úvod

Z literárních údajů je zřejmé, že studium kontinuální biosyntézy aminokyselin (dosud popsány pouze kyselina L-glutamová a L-lysin) je možno rozdělit do 3 základních okruhů problémů. Jedná se o stabilitu produkčních auxotrofních mikroorganismů, studium a návrh parametrů vlastního produkčního procesu a konečně snahu o dlouhodobé udržení sterility kontinuální kultury. Slezák *et al.* (1969) a Davydovič *et al.* (1974) popsali reverzi produkčních mikroorganismů na neprodukční prototrofní kmene v kontinuální kultivaci. Předpokládá se, že tento problém je řešitelný přípravou vícestupňových mutant. V souhlasu s povahou biosyntetického procesu jsou používány vícestupňové kontinuální systémy. Přehled prací a poznatků je shrnut např. v monografii autorů Mežinjá *et al.* (1974). Třístupňová a čtyřstupňová kontinuální biosyntéza lysinu jsou popsány také v patentové literatuře (sovětské patenty č. 255 161 a 258 845, 1973; československý patent č. 170 437, 1977). Prvý stupeň slouží k propagaci buněk kultury (růstová fáze) a vlastní biosyntetický proces probíhá v dalších fermentorech. Biosyntéza aminokyselin je řízena dávkováním živin do jednotlivých fermentačních stupňů kontinuálního systému (s výjimkou posledního). Všechny doposud popsané kontinuální procesy využívaly jako hlavního zdroje uhlíku sacharózu. Pouze práce polských autorů (Blaszczyk *et al.*, 1980) je zaměřena na použití kyseliny octové. Bohaté fermentační půdy, pH fermentace v okolí hodnoty 7 i vlastní podstata kontinuálního systému jsou faktory, které značně ztěžují dlouhodobé udržení sterility fermentace. Tímto problémem se zabývala řada autorů (zvláště při studiu biosyntézy kyseliny glutamové) a adaptovali produkční kultury k přídavku různých inhibitorů růstu kontaminujících mikroorganismů nebo přímo připravili produkční mutanty rezistentní ke směsi antibakteriálních látek (Ueda 1969; Beker a Viestur, 1970, Yamada, 1972).

Předložená studie je příspěvkem k řešení prvého a druhého ze zmíněných okruhů problémů. Otázka dodatečné genetické stability produkčního mikroorganismu byla řešena přípravou supresorové mutanty výchozího auxotrofního kmene *Brevibacterium sp.* Hom⁻, AEC^r (československý patent č. 206 946, 1981).

MATERIÁL A METODY

Kultura: Supresorová mutanta *Brevibacterium sp.* CCM AO 6/79, připravená jako produkční mikroorganismus vhodný pro kontinuální biosyntézu lysinu.

Kultivační podmínky: Po nárůstu v termostatu na maseoentonovém agaru (28 °C, 36–48 hodin) byla kultura převedená do inokulačních třepacích 500 ml baněk (50 ml půdy obsahující 25 g · l⁻¹ sacharózy a 30 g · l⁻¹ kukuřičného výluhu, pH 7,0). Po uplynutí 30 hodin bylo inokulum převedeno do inokulačního 20 litrového fermentoru (2 % obj.) obsahujícího stejnou půdu (pracovní objem 10 l, mísání 350 min⁻¹, vzdušnění 10 l · min⁻¹, 4 zárázky, 2 otevřená turbínová míchadla se 6 lopatkami $D_m = 0,5 D_t$, teplota 28 °C). Kultivační doba 14 hodin.

Jako vlastní kontinuální fermentační systém byly použity 20 litrové fermentory se stejným vnitřním uspořádáním (mísání 470 min⁻¹, teplota 28 °C) a následující výchozí půdou (též přítok do 1. stupně systému): sacharóza 150 g · l⁻¹, kyselý hydrolyzát arašídové mouky 200 ml · l⁻¹ (neutralizovaný amoniakem, odpovídá 30 g · l⁻¹ mouky), kukuřičný výluh 10 g · l⁻¹ (odpovídající podíl po rozpuštění a separaci tuhého podílu), KH₂PO₄ 2 g · l⁻¹, MgSO₄ · 7H₂O 0,3 g · l⁻¹, technický biotin (1 %) 0,005 g · l⁻¹, thiamin 0,0002 g · l⁻¹, polypropylénglykol (PPG) 0,2 ml · l⁻¹. V souhlasu s našimi nálezy a literárními údaji (např. Beker *et al.*, 1973) byl v obou fermentorech používán různý režim vzdušnění, v prvním stupni 10 l · min⁻¹ (1 VVM) a v druhém stupni 3 l · min⁻¹ (0,3 VVM). pH půdy bylo automaticky udržováno na hodnotě 6,8–7,0 dávkováním NH₄OH nebo NaOH. Systém jednotlivých průtoků a pracovních objemů (1. stupeň 7–10 l, 2. stupeň 7–12 l) byl upraven tak, aby splňoval požadavky na dosažení žádaných zředovacích rychlostí, resp. dob zdržení. Splnění těchto požadavků bylo limitováno charakteristikami fermentorů a čerpací techniky. Do 2. stupně byla dávkována směs sacharózy a kyselého hydrolyzátu arašídové mouky, takže celková dávka v závěrečných pokusech činila 180 g · l⁻¹ sacharidu a 250 ml · l⁻¹ hydrolyzátu. V průběhu fermentací bylo k odpěnování používáno PPG. Přítok půdy do systému byl zahájen v 6.–12. hodině po inokulaci (10 % obj.). Další podmínky fermentací jsou uvedeny v experimentální části.

Analytické metody: Růst kultury byl sledován gravimetricky, koncentrace L-lysinu byla stanovena manometricky pomocí lysidekarboxylázy (Kleinzeller et al., 1954), obsah volných aminokyselin papírovou chromatografií a chromatografií na tenké vrstvě (Jones a Heathcote, 1966).

VÝSLEDKY

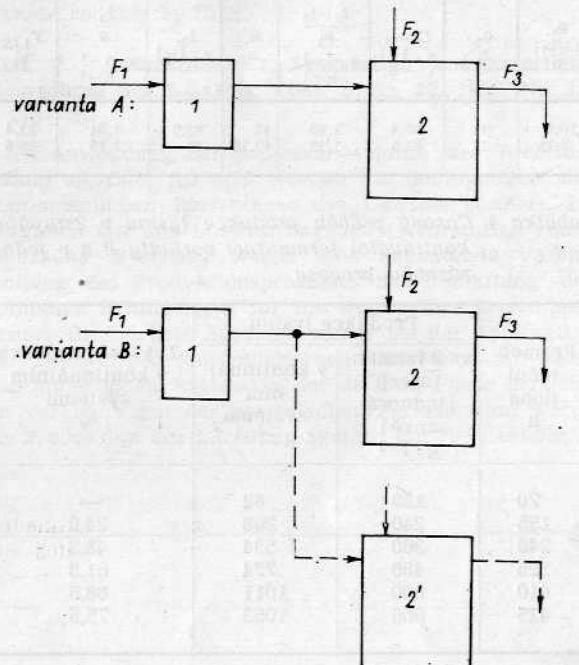
Vícestupňové kontinuální systémy popsané v literatuře vyhovují velmi dobře charakteru produkčního procesu (růstová a produkční fáze) i vlastnostem používaných auxotrofních mutant. Z realizačního hlediska je ovšem použití 3stupňového a dokonce 4stupňového kontinuálního systému pro složitost zcela neperspektivní. Naší snahou bylo nalézt takové uspořádání, které by bylo jednodušší a současně vyhovovalo kinetice biosyntézy lysinu s novým kmenem. Rozborem jednorázového procesu (průměrná výtěžnost činila $60 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ L-lysinu za 70 hodin) byly potvrzeny literární údaje o nutnosti oddělení růstové a produkční fáze fermentace. Tato skutečnost byla ověřena též experimentálně v jednostupňové kontinuální fermentaci. Základem práce byl 2stupňový systém, jehož parametry byly částečně optimalizovány během studia. Podobně jako v předešlých případech 1. stupeň systému pracoval jako kontinuální inkulátor a hlavním prvkem optimalizace jeho režimu v této práci byla růstová produktivita $D_1 X_1 (\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$. Naměřené údaje jsou v tabulce 1. Z tabulky je zřejmá značně plochá závislost růstové produktivity fermentačního stupně při vyšších zřeďovacích rychlostech. Relativně nižší hodnoty produktivity odpovídají vlastnostem nového kmene a jeho snížené růstové rychlosti ve srovnání s výchozí auxotrofní mutantou (na úrovni baněk zjištěna $\mu_{\max} = 0,31 \text{ vers. } 0,52 \text{ h}^{-1}$). Také v hodnotě saturační konstanty růstu na sacharóze byly nalezeny významné rozdíly ($K_s = 0,259 \text{ vers. } 0,105 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$). Při volbě optimální zřeďovací rychlosti v 1. stupni D_1 bylo rozhodující množství a stav buněk kultury vstupujících do 2. (produkčního) stupně. Měřením bylo potvrzeno, že produkční aktivitě kultury vyhovuje nejlépe rozsah $D_1 = 0,10-0,14 \text{ h}^{-1}$.

Tabulka 1. Kinetika růstu a produkce lysinu kulturou *Brevibacterium sp.* CCM AO 6/79 v 1. stupni kontinuálního systému

$D_1 \text{ h}^{-1}$	$\theta_1 (1/D_1) \text{ h}$	$X_1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$	$D_1 X_1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	$L_1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$	$D_1 L_1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
0,05	20,0	9,0	0,45	11,0	0,55
0,08	12,5	8,2	0,65	8,6	0,69
0,10	10,0	8,2	0,82	5,0	0,50
0,12	8,33	6,5	0,78	3,2	0,385
0,14	7,15	5,7	0,80	2,5	0,35
0,155	6,45	5,4	0,84	1,3	0,20
0,19	5,25	4,0	0,76	—	—

Pracovní režim 2. stupně kontinuálního systému byl testován ve dvou modifikacích vždy s dalším příchodem sacharózy a hydrolyzátem mouky. V prvním případě jsme použili kontinuální postup, který ovšem složil jako srovnávací. Z literárních údajů i našeho studia vyplývá, že vícestupňové systémy lépe vyhovují povaze biosyntetického procesu především proto, že dalším příchodem jednotlivých živin je možno lépe stimulovat vysokou produkční aktivitu kultur a řídit celý proces. Jako kompromisní řešení vyhovující lépe požadavkům biosyntézy lysinu než 2-stupňový kontinuální postup a představující

současně významné zjednodušení fermentačního systému (ve srovnání s popsanými 3stupňovými a 4stupňovými fermentacemi) byl navržen 2. stupeň se semikontinuálním režimem (přesněji 2 fermentory pracující semi-kontinuálně ve střídavém cyklu). Toto řešení bylo také umožněno díky vlastnostem nové produkční mutanty (např. snížené nutriční požadavky ve srovnání s klasickými auxotrofními kmeny). Popsané a použité fermentační systémy jsou znázorneny na schématu 1. Naměřená kinetika biosyntézy lysinu v 2stupňovém kontinuálním systému (varianta A) je uvedena v tabulce 2.



Obr. 1. Modifikace dvoustupňového kontinuálního systému

Tabulka 2. Produkce lysinu kulturou *Brevibacterium sp.* CCM AO 6/79 v 2. stupni a celém systému kontinuálního procesu (varianta A)

$\theta_1 (1/D_1) \text{ h}$	$\theta_2 (1/D_2) \text{ h}$	$L_2 - L_1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	$\frac{L_2 - L_1}{\theta_2} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	$\theta, \text{ h}$	$L_2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$	$\frac{L_2}{\theta} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	$Y_{L/S} \%$
20,0	38	30	0,79	58	41	0,71	22,8
10,0	33	36	1,09	43	41	0,95	22,8
8,33	31	35	1,13	39,33	38	0,97	21,2

Pracovní režim 2. stupně varianty B spočíval ve střídání 8hodinových časových intervalů, charakterizovaných odběrem poloviny obsahu fermentoru s následujícím kontinuálním dočerpáním na původní objem a dokončením cyklu jednorázovou přítokovanou fermentací. V tomto smyslu se tedy fermentory 2 a 2' střídaly ve fázích pracovního cyklu. Naměřené výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Ze srovnání výsledků uvedených v jednotlivých tabulkách vyplývá, že za stejných podmínek ($D_1 = 0,10 \text{ h}^{-1}$) jsou výsledky při uspořádání B příznivější (produkční rychlosť v 2. stupni 1,20 vers. 1,09 $\text{g lysinu} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $Y_{L/S} 23,4$ vers. 22,8 %). Další měření a srovnávání při vyšší zřeďovací rychlosti v 1. stupni bylo omezeno aparaturou. Přesto výsledky hovoří již jednoznačně ve prospěch varianty se semikontinuálním režimem ve 2. stupni.

Zvýšením D_1 se produkční rychlosť i celková produktivita systému významně zvýšila. O skutečnosti, že varianta B vyhovuje lépe fyziologickým požadavkům biosyntetického procesu svědčí i změny v koeficientu konverze sacharózy na lysin $Y_{L/S}$, který se v tomto případě zvýšil až na 25,5 % (u varianty A naopak mírný pokles).

Tabulka 3. Produkce lysinu kulturou *Brevibacterium sp.* CCM AO 6/79 v 2. stupni a celém systému kontinuálního procesu (varianta B)

θ_1 , (1/D ₁) h	θ_2 , h	$L_2 - L_1$ g · l ⁻¹	$\frac{L_2 - L_1}{\theta_2}$ g · l ⁻¹ · h ⁻¹	θ , h	L_2 , g · l ⁻¹	$\frac{L_2}{\theta}$ g · l ⁻¹ · h ⁻¹	$Y_{L/S}$, %
10,0 7,15	32 33	38,4 43,5	1,20 1,32	42 40,15	42,5 48	1,01 1,15	23,4 25,5

Tabulka 4. Časový průběh produkce lysinu v 2stupňové kontinuální fermentaci variandy B a v jednorázovém procesu

Fermen-tační doba h	Produkce lysinu		Zvýšení produkce v kontinuálním systému %
	ve 2 fermentorech (jednorázově) g · l ⁻¹	v kontinuál-ném systému g · l ⁻¹	
70	120	62	—
155	240	298	24,0
240	360	534	48,3
325	480	774	61,3
410	600	1011	68,5
425	600	1053	75,5

DISKUSE

V úvodní části práce je zmínka o hlavních problémech doprovázejících řešení kontinuální biosyntézy L-lysinu. Genetická stabilita produkčního kmene byla zvládnuta přípravou supresorové mutanty. Očekávané vlastnosti kultury byly experimentálně potvrzeny na úrovni dlouhodobého pasážování baňkových kultur (s ověřováním produkční kapacity) i na úrovni popsaného kontinuálního systému (průměrná délka fermentace 200 hodin).

Ze srovnání obou variant kontinuálního procesu vyplývá výhodnost systému B , který podle předpokladu lépe vyhovuje požadavkům biosyntézy lysinu a jejího řízení. Možno předpokládat, že semikontinuální režim ve 2. stupni je přibližnou simulací 2. a 3. stupně 3stupňového systému s dostatečnou možností regulace biosyntézy aminokyselin. Již první srovnání s výsledky jednorázové fermentace (60 g · l⁻¹ za 70 hodin, tedy produkativita 0,86 g · l⁻¹ · h⁻¹) vyznívá jednoznačně ve prospěch kontinuálního procesu. Výhody kontinuálních systémů se výrazně projevují až při dostatečné délce fermentace. Počátek je doprovázen ztrátovým časem, který je úměrný délce ustalování rovnovážného stavu (v našem případě bylo tohoto stavu na výtoku na systému dosahováno přibližně po 80 hodinách fermentace). Další ztráty představuje neprodukční první stupeň systému. Jednalo se také o to, nalézt takové uspořádání, ve kterém je podíl časových ztrát z růstového fermentoru nejnižší. Na druhé straně je také průběh jednorázové fermentace doprovázen ztrátovým časem. Při uvažování dlouhodobé série fermentací je úměrný časovému intervalu mezi jednotlivými procesy, délce růstové a produkční lag-fáze. Bilanční dlouhodobé srovnání obou typů fermentace je

uváděno v tabulce 4. Každý z obou produkčních fermentorů varianty B poskytuje 46 g lysinu · l⁻¹ za 33 hodin, tedy 1,39 g · l⁻¹ · h⁻¹. Pro srovnání jsme použili dva jednorázově pracující fermentory (produkce 60 g · l⁻¹ za 70 hodin, interval mezi fermentacemi 15 hodin). Z tabulky je zřejmé výrazné zvýšení produkce aminokyselin v kontinuálním systému, přičemž kontinuální produkce převažuje přibližně od 100. hodiny. Na úrovni 400 hodinového časového intervalu představuje zvýšení téměř 70 %.

Předložená studie je příspěvkem k problematice kontinuální biosyntézy aminokyselin, ve které byl použit nový typ produkčního mikroorganismu i nový typ kontinuálního systému. Po další optimalizaci kultivačních podmínek (parametry kontinuálního systému, složení fermentační půdy i přítoku atd.) by bylo možno dosáhnout dalšího zvýšení produkce. V jednorázovém procesu bylo např. dosahováno produkční rychlosti až 1,7 g · l⁻¹ · h⁻¹ a konverze sacharózy na lysin byla až 32 %. Je však zřejmé, že z realizačního hlediska by v současné době bylo největším problémem udržení sterilních podmínek v dlouhodobém procesu i za popsaných zjednodušených podmínek. Bilanční rozbor fermentací a metabolismu kultury (např. současná produkce dalších aminokyselin) budou předmětem dalšího sdělení.

Použité symboly

- X — koncentrace buněk kultury, g sušiny biomasy · l⁻¹
 L — koncentrace L-lysinu, g · l⁻¹
 F — rychlosť přítoku nebo výtoku ze systému, ml · l⁻¹
 V — pracovní objem fermentoru, l
 μ — specifická růstová rychlosť, h⁻¹
 D — zrežovací rychlosť, h⁻¹
 θ — střední doba zdržení, h
 DX — růstová produktivita, g sušiny biomasy · l⁻¹ · h⁻¹
 $DL \left(\frac{L}{\theta} \right)$ — biosyntetická produktivita, g L-lysinu · l⁻¹ · h⁻¹
 K_s —aturační konstanta růstu na sacharózu, g · l⁻¹
 Y_{L/S} — konverzní koeficient, % (g produktovaného lysinu/g spotřebované sacharózy · 100)

Indexy: 1 — první stupeň systému
 2 — druhý stupeň systému
 žádný — celý kontinuální systém

Literatura

- [1] BEKER, M. E., VIESTURE, L. A.: Mikrobiol. promyšl., 1970, č. 3, s. 55
- [2] BEKER, M. E., MEŽINJA, G. R., RUKLIŠA, M. P., VIESTURE, V. E., SELGA, S. L., ALEXANDROVA M., APSITE, A. I., SAVENKOV, V. V.: Proc. 1st Int. Symp., Adv. Microbial Engr., J. Wiley and Sons, New York, 1973, s. 233
- [3] Československý patent č. 170 437, 1977
- [4] Československý patent č. 206 946, 1981
- [5] BLASZCZYK, R., JAMROZ, T., KRÝSTEK, L., MICHALSKI, H., WIĘCZOREK, A.: Zesz. Nauk. Politech. Łódź, Chem. Spożyw. 361 (35), 1980, s. 293
- [6] DAVYDOVIČ, T. I., PEČURKIN, N. S., SOMOVA, L. A.: Fermentacija, Zinatne, Riga, 1974, s. 74
- [7] JONES, K., HEATHCOTE, J. G.: J. Chromatogr. 24, 1966, s. 106
- [8] KLEINZELLER, A., MÁLEK, J., VRBA, R.: Manometrické metody a jejich použití v biologii a biochemii, SZN, Praha, 1954
- [9] MEŽINJA, G. R., KRISTAPSON, M. Ž., SAVENKOV, V. V.: Teorija i praktika neprerivnogo kultivirovaniya mikroorganizmov, Nauka, Moskva, 1974
- [10] SLEZÁK, J., SKYTA, B., PLACHÝ, J., BŘEČKA, A.: Proc. 4th Int. Symp. Continuous Cult., Prague, 1969, s. 505
- [11] UEDA, K.: Proc. 3rd Int. Ferment. Symp., Academic Press, London, New York, 1969, s. 43
- [12] SSSR patent č. 255 161, 1973
- [13] SSSR patent č. 258 845, 1973
- [14] YAMADA, K.: The microbial production of amino acids, Kodansha Ltd., Tokyo, 1972

Pilát, P., Palečková, F.: **Dvoustupňová kontinuální biosyntéza L-lysinu.** Kvas. prům., 28, 1982, č. 12, s. 278—281.

S využitím supresorové mutanty *Brevibacterium sp.* CCM AO 6/79 jsme studovali podmínky kontinuální biosyntézy L-lysinu. Ve srovnání s literárními údaji (vícestupňové kontinuální systémy) byl produkční proces významně zjednodušen při dodržení optimálních podmínek biosyntézy aminokyseliny. Nejvyšší výtěžnosti bylo dosaženo při použití dvoustupňové kontinuální kultury se semikontinuálním režimem ve druhém stupni. Ve srovnání s jednorázovou fermentací se produkce L-lysinu zvýšila přibližně o 70 %.

Пилат, П., Палечкова, Ф.: Двухступенчатый непрерывный биосинтез L-лизина. Квас. прум. 28, 1982, Но. 12, стр. 278—281.

С применением супрессорного мутанта *Brevibacterium sp.* CCM AO 6/79 изучались условия непрерывного биосинтеза L-лизина. По сравнению с литературными данными (многоступенчатые непрерывные системы) процесс продукции был значительно упрощен при соблюдении оптимальных условий биосинтеза аминокислоты. Высший выход был достигнут при применении двухступенчатой непрерывной культуры с полунепрерывным режимом во второй степени. По сравнению с периодической ферментацией продукция L-лизина повысилась приблизительно на 70 %.

Pilát, P., Palečková, F.: **Two-stage continuous biosynthesis of L-lysine.** Kvas. prům., 28, 1982, No. 12, pp. 278—281.

The conditions of the L-lysine continuous biosynthesis was studied using the suppressor mutant *Brevibacterium sp.* CCM AO 6/79. In contrast with literature data (multi-stage continuous systems the production process was simplified maintaining the optimal conditions of amino acid biosynthesis. The highest yields were achieved using the two-stage continuous culture with the semi-continuous regime in the second stage. When compared with batch culture the production of L-lysine was increased roughly by 70 %.

Pilát, P. - Palečková, F.: **Zweistufige kontinuierliche Biosynthese des L-Lysins.** Kvas. prům. 28, 1982, Nr. 12, S. 278—281.

Bei Anwendung der Supressor-Mutante des *Brevibacterium sp.* CCM AO 6/79 wurden die Bedingungen der kontinuierlichen Biosynthese des L-Lysins studiert. Im Vergleich mit den Literaturangaben (mehrstufige kontinuierliche Systeme) wurde eine bedeutende Vereinfachung des Produktionsprozesses bei Einhaltung der optimalen Bedingungen für die Aminosäure-Biosynthese erzielt. Die höchste Ausbeute wurde bei der Applikation der zweistufigen kontinuierlichen Kultivation mit semi-kontinuierlichen Regime in der zweiten Phase erreicht. Im Vergleich mit der periodischen Fermentation wurde die Produktion des L-Lysins ungefähr um 70 % erhöht.