

Biosyntéza L-lysinu na bázi psofokarpové mouky jako zdroje dusíku

635.15 547.466.4

RNDr. FRANTIŠEK SMÉKAL, CSc., RNDr. MIROSLAV BÁRTA, PhMr. VLADIMÍR BULANT, Ing. STANISLAV ULBERT,
Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

Klíčová slova: *L-lysine, biosyntéza, mouka psofokarpová, Corynebacterium glutamicum, Brevibacterium flavum*

Fermentační příprava esenciální aminokyseliny L-lysinu produkčními mikroorganismy *Corynebacterium glutamicum* a *Brevibacterium flavum* je popsána v řadě publikací na bázi sacharosy nebo melasy a komplexních zdrojů dusíku jako jsou hydrolyzátý sójové nebo arašídové mouky a proteinů (např. kaseinu, sójového proteinu apod.). Množství a kvalita dusíkatého zdroje mají rozhodující význam pro růst produkčních mikroorganismů a optimální průběh biosyntézy. Produkce L-lysinu na bázi nestandardních zdrojů dusíku jako jsou hydrolyzátý řepkového, lněného a bavlníkového šrotu, dále krmných kvásnic byla již popsána dříve [1]. Perspektivním dusíkatým substrátem pro fermentační technologie se jeví psofokarpová mouka získaná mletím bobů *Psophocarpus tetragonolobus*. Cílem práce bylo ověřit možnosti aplikace psofokarpové mouky, resp. jejího hydrolyzátu pro biosyntézu L-lysinu jako náhrady hydrolyzátu arašídové mouky ve fermentačním médiu.

MATERIÁL A METODY

Použité produkční mikroorganismy: *Corynebacterium glutamicum* 7/11, *Corynebacterium glutamicum* 543, *Corynebacterium glutamicum* 544, *Corynebacterium glutamicum* 49 a *Brevibacterium flavum* Cb. Kmeny byly udržovány pasážováním na MPA agarech po 21 dnech a uchovávány při 5 °C. L-lysin se stanovuje oscilopolarograficky, redukující látky a analýza aminokyselin hydrolyzátů metodami popsanými dříve [2, 3]. Příprava psofokarpové mouky [4]: boby se rozemírají na laboratorním mlýnku po dobu 6–8 min; jemný mletý materiál se proseje na sítu a odpad se podrobí opakování mletí; kyselá hydrolyza psofokarpové mouky, podobně jako složení fermentačních médií, postup přípravy L-lysinu v laboratorním měřítku jsou stejně jako v případě aplikace hydrolyzátu arašídové mouky, jak bylo publikováno dříve [1].

VÝSLEDKY A DISKUSE

Rozhodujícími faktory, které ukazují na možnost aplikace nestandardního zdroje dusíku, jsou hodnoty aminokyselinového složení hydrolyzátů. Významná je koncentrace některých aminokyselin, které jsou nezbytné pro růst produkčních mikroorganismů. Vzhledem k tomu, že řada producentů jsou mutanty vyžadující homoserin nebo leucin, jsou v hydrolyzátech rozhodující množství treoninu a metioninu (mikroorganismy jsou schopny tyto aminokyseliny konvertovat na homoserin) a leucinu. Proto byla porovnána množství uvedených aminokyselin v hydrolyzátech psofokarpové, arašídové a sójové mouky. Analytická data ukázala na vyšší obsah treoninu a metioninu v psofokarpové mouce proti obsahu obou aminokyselin v arašídové mouce. Naopak obsah metioninu v hydrolyzátu sójové mouky je značně vyšší proti množství metioninu u výše uvedených zdrojů dusíku. Výsledky analýz aminokyselin v hydrolyzátech psofokarpové, arašídové a sójové mouky ukazuje tabulka 1.

Tabulka 1. Zastoupení některých významných aminokyselin v hydrolyzátech psofokarpové, arašídové a sójové mouky

| Aminokyselina [mg/ml] | Hydrolyzát | | |
|--------------------------|-----------------------|--------------------|-----------------|
| | psofokarpové mouky | arašídové mouky | sójové mouky |
| treonin | 1,01 | 0,73 | 0,54 |
| metionin | 0,65 | 0,51 | 0,90 |
| leucin | 3,19 | 1,98 | 1,10 |
| celk. N [mg/ml] | 7,0 | 10,2 | 9,0 |

Tabulka 2. Obsah některých významných aminokyselin v hydrolyzátech psofokarpové mouky z bobů var. Binh-Minh a var. Chimbu

| Aminokyselina [mg/ml] | Hydrolyzát | |
|--------------------------|------------|--------|
| | Binh-Minh | Chimbu |
| treonin | 1,17 | 1,05 |
| metionin | 0,31 | 0,42 |
| leucin | 2,26 | 2,49 |
| celk. N [mg/ml] | 6,4 | 6,3 |

Dále byly srovnávány analýzy aminokyselin v hydrolyzátech psofokarpové mouky, která byla připravena z bobů *Psophocarpus tetragonolobus*, varianty Binh-Minh a varianty Chimbu. Množství aminokyselin v obou typech hydrolyzátů jsou srovnatelná a ukazují na malé rozdíly mezi oběma variantami psofokarpových bobů. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Sledování biosyntézy L-lysinu na fermentačních médiích s použitím hydrolyzátu psofokarpové mouky bylo provedeno s produkčním kmenem *Corynebacterium glutamicum* 7/11 na této typech hydrolyzátů: a) jemně mletých celých bobů, b) částečně odslupkovaných bobů a c) „slupkovém“ substrátu. Uvedené zdroje byly zpracovány standardním postupem kyselé hydrolýzy, jako kontroly bylo použito hydrolyzátu arašídové mouky. Na základě zjištěných hodnot celkového dusíku a aminodusíku byla sestavena experimentální fermentační média pro testování produkce L-lysinu u uvedeného bakteriálního kmene.

Fermentace probíhala standardním způsobem v laboratorních podmínkách v baňkách při 29 °C po dobu 96 h na rotační třebačce. Hodnoty produkci L-lysinu jsou shrnuti v tabulce 3. Tímto způsobem byla experimentálně prokázána možnost aplikace hydrolyzátu mletých celých psofokarpových bobů jako náhrady hydrolyzátu arašídové mouky. Dále byla ověřována schopnost

jiných mutant *Corynebacterium glutamicum* syntézovat L-lysín. Tyto produkční mikroorganismy se navzájem odlišují pouze rezistencí k analogům aminokyselin. Fermentační postup probíhal analogicky, jak je uvedeno. Produkční charakteristika u mutant *Corynebacterium glutamicum* je uvedena v tabulce 4.

Tabulka 3. Produkce L-lysínu u kmene *Corynebacterium glutamicum* 7/11 na fermentačních médiích s hydrolyzáty mletých celých bobů, odslupkovaných bobů a „slupkovém“ substrátu

| Zdroj dusíku | Produkce L-lysínu [g/l média/96 h] | Konverze uhlíkatého zdroje [%] |
|--|------------------------------------|--------------------------------|
| hydrolyzát mletých celých bobů | 48,6 | 28 |
| hydrolyzát mletých odslupkovaných bobů | 40,0 | 26 |
| hydrolyzát mletého „slupkového“ substrátu | 27,1 | 27 |
| hydrolyzát arašídové mouky (kontrol. postup) | 49,7 | 33 |

Tabulka 4. Produkce L-lysínu produkčními mutantami *Corynebacterium glutamicum* na hydrolyzátech psofokarpové mouky

| Produkční kmen | Produkce L-lysínu [g/l média/72 h] |
|--|------------------------------------|
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> 7/11 | 44,4 |
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> 543 | 35,8 |
| <i>Corynebacterium glutamicum</i> 544 | 40,0 |

Uvedené výsledky produkcií L-lysínu ukazují na univerzální aplikaci hydrolyzátu psofokarpové mouky pro produkční mutanty *Corynebacterium glutamicum*.

Zajímavá zjištění ukázaly pokusy s prototrofním kmenem *Corynebacterium glutamicum* 49, který se vyznačuje pouze rezistencí ke dvěma analogům aminokyselin. U tohoto kmene byly při minimalizaci množství dusíku zjištěny významné produkce L-lysínu; fermentační média obsahovala limitovaná množství hydrolyzátu psofokarpové mouky jako náhradu za kukuřičný výluh (corn-steep). Výsledky pokusů jsou uvedeny v tabulce 5. Vedené možnosti náhrady corn-steepu má hydrolyzát psofokarpové mouky pozitivní vliv na výši konverze uhlíkatého zdroje na L-lysín.

Dále byla ověřována produkce L-lysínu na fermentačních médiích, která obsahovala hydrolyzáty dvou variant psofokarpových bobů (var. Bin-Minh a Chimbu). Jako produkčního kmene bylo použito mutanty *Brevibacterium flavum* Cb. Produkce L-lysínu na obou typech hydrolyzátu psofokarpové mouky byla srovnávána s produkcií lysínu na fermentačním médiu s hydrolyzátem arašídové mouky. Fermentační postup je stejný jako v případě produkčních kmenů *Corynebacterium glutamicum*. Výsledky pokusů u mutanty *Brevibacterium flavum* Cb jsou uvedeny v tabulce 6. Zjištěné produkce L-

Tabulka 5. Produkce L-lysínu u prototrofního kmene *Corynebacterium glutamicum* 49 na fermentačních médiích s limitovaným množstvím hydrolyzátu psofokarpové mouky

| Hydrolyzát [% obj.] | Produkce L-lysínu [g/l média/96 h] | Konverze uhlíkatého zdroje [%] |
|-----------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| 2 % | 36,0 | 30 |
| 4 % | 36,6 | 30 |
| 6 % | 44,4 | 37 |
| 1,5 % corn-steep (kontrola) | 38,0 | 22 |

Tabulka 6. Produkce L-lysínu u kmene *Brevibacterium flavum* Cb na fermentačních médiích s různými hydrolyzáty psofokarpové mouky

| Typ hydrolyzátu | Produkce L-lysínu [g/l média/96 h] |
|---|------------------------------------|
| hydrolyzát psofokarpové mouky, var. Binh-Minh | 31,6 |
| hydrolyzát psofokarpové mouky, var. Chimbu | 33,3 |
| hydrolyzát arašídové mouky (kontrola) | 33,6 |

-lysínu jsou při aplikaci obou variant psofokarpové mouky prakticky stejné a shodné s kontrolním postupem.

Na základě výsledků z řady fermentací s různými produkčními kmeny byl vypracován laboratorní fermentační předpis pro biosyntézu L-lysínu a byl dále ověřován v měřítku 2 l laboratorních fermentačních tanků. Jako testovacích kmenů bylo použito mutant *Corynebacterium glutamicum* 7/11 a *Brevibacterium flavum* Cb. Fermentační postup v laboratorních tanicích probíhal standardním způsobem při teplotě 29 °C, optimálním plněním tanku fermentačním médiem, při standardním míchání a aeraci a běžné úpravě pH média v průběhu kultivace. Fermentace probíhala po dobu 96 h. S produkčním kmenem *Corynebacterium glutamicum* 7/11 bylo dosaženo 71,2 g L-lysínu/l média, u kmene *Brevibacterium flavum* Cb představuje produkce L-lysínu 70,9 g/l média.

Výsledky ověřovacích pokusů s fermentační přípravou L-lysínu na bázi hydrolyzátu psofokarpové mouky ukazují na reálnou možnost vypracování nového technologického postupu výroby této významné esenciální aminokyseliny.

Literatura

- [1] SMÉKAL, F., BULANT, V., KINDLOVÁ, E., MAZALOVÁ, M., ULBERT, S.: Kvas. prům., **28**, 1982, s. 39
- [2] BULANT, V., BULANTOVÁ, H., SMÉKAL, F.: Proceed. „Heyrovsky Memorial Congress on Polarography“, Part II, Praha 1980, s. 26
- [3] SMÉKAL, F., PELECHOVÁ, J., HLADÍKOVÁ, B.: Kvas. prům., **28**, 1982, s. 108
- [4] POSPIŠIL, F., a kol.: Psofokarpus — rostlina budoucnosti, VŠZ, Praha 1978

Smékal, F. - Bárta, M. - Bulant, V. - Ulbert, S.: Biosyntéza L-lysínu na bázi psofokarpové mouky jako zdroje dusíku. Kvas. prům. **30**, 1984, č. 6, s. 133–135.

Byla studována biosyntéza L-lysínu u kmenů *Corynebacterium*

terium glutamicum a *Brevibacterium flavum* na fermentačních médiích, která obsahovala jako komplexní zdroj dusíku hydrolyzát psofokarpové mouky, připravené mletím bobů Psophocarpus tetragonolobus. Analýza aminokyselin prokázala možnost nahradit hydrolyzátu arašídové mouky tímto nestandardním zdrojem dusíku. S kmeny *Corynebacterium glutamicum* se dosahuje 44–48 g L-lysinu/l fermentačního média za 96 h kultivace, u kmenů *Brevibacterium flavum* se produkuje L-lysinu pohybují mezi 30–33 g/l média za stejnou dobu kultivace. V měřítku 2litrových fermentačních tanků bylo dosaženo produkce 70 g L-lysinu/l fermentačního média. Psofokarpová mouka představuje významný zdroj dusíku pro fermentační technologie.

Смекал, Ф., Барта, М., Булант, В., Ульберт, С.: Биосинтез L-лизина на базе псофокарповой муки как источника азота. Квас. прум. 30, 1984, № 6, стр. 133—135.

Изучался процесс биосинтеза L-лизина штаммами *Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavum* в ферментационных средах, содержащих в качестве комплексного источника гидролизат псофокарповой муки, полученной размолом бобов *Psophocarpus tetragonolobus*. Анализ аминокислот доказал, возможность замены гидролизата арахисовой муки этим нестандартным источником азота. С штаммами *Corynebacterium glutamicum* достигается выхода 44–48 г. L-лизина на літр культивирующей среды в течение 96 часов культивирования, в случае штамма *Brevibacterium flavum* продукция L-лизина колеблется в пределах 30–33 г/л среды в течение того же времени культивирования. В масштаве ферментационных танков емкостью в два литра получалась продукция 70 г L-лизина/л ферментационной среды. Псофокарповая мука представляет собой значительный источник азота для технологий ферментации.

Smékal, F. - Bárta, M. - Bulant, V. - Ulbert, S.: Biosyn-

thesis of L-Lysine with Psophocarpus Flour as Nitrogen Source. Kvas. prum. 30, 1984, No. 6, pp. 133—135.

Biosynthesis of L-Lysine with the strains *Corynebacterium glutamicum* and *Brevibacterium flavum* were studied in media with a hydrolysate of psophocarpus flour. This hydrolysate served as the complex nitrogen source. The flour was obtained from grinding of beans of *Psophocarpus tetragonolobus*. The analysis of amino-acids proved a possibility of the replacement of peanut flour with this non-standard nitrogen source. The production of L-lysine in 96 h's cultivations with *Corynebacterium glutamicum* was 44–48 g.l⁻¹ while with *Brevibacterium flavum* was between 30–33 g.l⁻¹. The production of L-Lysine on a laboratory scale in 2 l tanks was 70 g.l⁻¹. Psophocarpus flour is a significant nitrogen source utilizable in the fermentation industry.

Smékal, F. - Bárta, M. - Bulant, V. - Ulbert, S.: Biosynthese des L-Lysins auf Basis des Psophocarpus-Bohnen-Mehls als Stickstoffquelle. Kvas. prum. 30, 1984, Nr. 6, S. 133—135.

Es wurde die Biosynthese des L-Lysins bei Stämmen *Corynebacterium glutamicum* und *Brevibacterium flavum* auf Fermentationsmedien studiert, die als komplexe Stickstoffquelle das Hydrolysat enthielten, welches aus dem Mehl aus den Bohnen *Psophocarpus tetragonolobus* erzeugt wurde. Die Analyse der Aminosäuren bestätigte die Möglichkeit des Ersatzes des Erdnußmehlhydrolysats durch diese nicht übliche Stickstoffquelle. Mit den Stämmen *Corynebacterium glutamicum* wird eine L-Lysin-Produktion von 44–48 g pro Liter Fermentationsmedium in 96 Stunden der Kultivation erzielt, bei dem Stamm *Brevibacterium flavum* bewegt sich die L-Lysin-Produktion zwischen 30 und 33 g/l Medium bei der gleichen Kultivationsdauer. In 2-Liter-Fermentationstanks wurde eine Produktion von 70 g L-Lysin/l Fermentationsmedium erzielt. Das Mehl aus *Psophocarpus-Bohnen* kann als eine bedeutende Stickstoffquelle für Fermentationstechnologien angesehen werden.

Vliv molekulové hmotnosti a stupně hydroxylace proantokyanidinů na koloidní stabilitu piva

V současné době se připouští, že oligomerní proantokyanidiny odpovídají spolu s bílkovinami za chladové zákaly piva. Není ovšem možno každému proantokyanidinu přisoudit ten podíl, který na něj připadá v tvorbě tohoto zákalu.

Autoři již jednou (Cerevisia, 1981, 29) stanovili strukturu dvou dimérů a tří trimérů proantokyanidinů ježmene vysokovýkonné chromatografie (HPLC), kyselou selektivní hydrolyzou a magnetickou nukleární rezonancí ¹H a ¹³C. Později stanovili Outrup a Schaumburg pomocí magnetické rezonance ¹H strukturu čtvrtého, méně často se vyskytujícího triméru v ječmenu *Nordal* a zcela nedávno Brandon et al. uvedli možnost přítomnosti tohoto čtvrtého triméru v ječmenu *Gwylan* z Nového Zélandu.

Všichni autoři souhlasně potvrzují jak kvantitativní tak kvalitativní důležitost oligomerních prodelfinidinů ježmene přesto, že až dosud se zabývali dimerními prokyanidinami, které se nalézají v menším měřítku ve sladu.

Aniž by předpokládali velmi pravděpodobně rozdílný vývoj prokyanidinů a prodelfinidinů během sladování,

chtěli autoři tohoto článku identifikovat složky, které konkurují vlivu těchto dvou typů proantokyanidinů na vznik chladového zákalu v pivu.

MULKAY, P. - JERUMANIS, J.: Effets du poids moléculaire et du degré d'hydroxylation des proanthocyanidines sur la stabilité collodiale de la bière. Cerevisia 8, 1983, č. 1, s. 20—35.

Šatava

Alfa-Laval a automatizace potravinářského průmyslu

Americká filiálka firmy Alfa-Laval získala podnik FLOE v Rochestru (New York). Tato firma (Fluid Operations and Equipment Inc) vyvíjí a zavádí systémy automatizace v průmyslu potravinářském, mlékárenském a chemickém. Firma Alfa-Laval sama dodává automatizované celky, avšak touto fází chce získat časový náskok, aby nemusela sama vyvíjet novou techniku. Proto se spojuje s firmou, která má v tomto oboru rozsáhlou praxi a zkušenosť. Ve Spojených státech je o automatizaci v potravinářském a mlékárenském průmyslu velký zájem.

Alfa-Laval prend possession d'une entreprise américaine d'automation. Industries Alimentaires et Agricoles 1983 č. 4, s. 265.

Janda