

Výzkum a výroba aminokyselin v Československu

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

Rozvoj fermentačních technologií, ke kterému došlo po druhé světové válce v souvislosti s výrobou antibiotik, umožnil koncem padesátých let využít metabolických schopností mikroorganismů také k přípravě aminokyselin. Získání mikroorganismů schopných hromadit v relativně vysokých množstvích aminokyseliny v prostředí a vypracování vhodných technologických postupů neobyčejně rozšířily možnosti využití těchto láttek. Aminokyseliny mají značný význam nejen ve výživě živřat — přidáním lysinu nebo methioninu do krmiv lze zvýšit výživovou hodnotu bílkovin obsažených v krmivech, ale nacházejí uplatnění i v potravinářství jako přísady zlepšující chut potravy (glutamová kyselina) nebo sladidla (např. glycín). Kromě krmivářství a potravinářství jsou aminokyseliny využívány také v medicínské oblasti k therapeutickým účelům (např. 3,4-dihydroxyphenylalanin je aplikován při léčbě Parkinsonovy nemoci) nebo při přípravě infúzních roztoků. Avšak aplikace aminokyselin se neomezuje jen na tyto oblasti. Ve stadiu výzkumu a vývoje je využití aminokyselin jako výchozích surovin chemického průmyslu při přípravě povrchově aktivních láttek s vynikajícími vlastnostmi pracími a pěnícími nebo při výrobě umělých vláken.

Mikrobiální příprava aminokyselin, postupně vytlačující procesy chemické syntézy a extrakce z bílkovinných hydrolyzátů, zahrnuje jak biotransformační procesy, záležející v přeměně prekurzorů nebo vhodných substrátů enzymovými systémy nebo jednotlivými enzymy na žádané aminokyseliny, tak postupy přímé fermentace, při kterých produkční organismy, obyčejně mutanty baktérií, v médiích s vhodným zdrojem uhlíku, dusíku a s minerálními solemi produkují a v prostředí hromadí významná množství aminokyselin.

Většina technologií pro přípravu aminokyselin byla vyvinuta a do průmyslového měřítka zavedena v Japonsku, zaujmajícím v celosvětovém měřítce vedoucí postavení ve výzkumu a výrobě aminokyselin. Představuje-li celkový roční příjem z této výroby ve světě 1 miliardu dolarů, připadá z toho téměř polovina (asi 450 miliónů dolarů) na Japonsko. Mezi přední výrobce patří firmy Ajinomoto Co. a Kyowa Hakko Kogyo, monopolně ovlá-

dající světový trh a aktivně se podílející i v zahraničí na rozvíjení tohoto odvětví fermentačního průmyslu budováním výrobních kapacit, patřících nadnárodním společnostem, v nichž obě firmy participují jako podílnici (např. společnost Eurolysine ve Francii nebo Albamex v Mexiku). Výrobou aminokyselin se zabývá také firma Tanabe Seiyaku Co. V tabulce 1 jsou uvedeny hlavní firmy, roční produkce a postupy používané při výrobě 5 aminokyselin, zaujmající přední místa svým ročním objemem výroby (Izumi et al., 1978; Hirose a Okada, 1979, — 1981).

Z aminokyselin je v průmyslovém měřítku vyráběna v největším množství L-glutamová kyselina, zaujmající svou roční produkcí 250 000 tun první místo z produktů fermentačního průmyslu. Z tohoto množství téměř poloviční

Tabulka 1. Výroba aminokyselin přesahujících svým ročním objemem 1 000 tun

Aminokyselina	Výrobce	Roční produkce — tun	Výrobní postup
L-glutamová kys.	Ajinomoto Kyowa	250 000	F
D, L-methionin	AEC Degussa	100 000	S
L-lysin	Kyowa Ajinomoto Eurolysine Albamex Rhône-Poulenc	25 000	F
Glycin	Ajinomoto Tanabe	3 000	S
L-asparagová kyselina	Ajinomoto Tanabe Kyowa	1 000	E

E — enzymová metoda

F — přímá fermentace

S — chemická syntéza

Tabulka 2. Postupy příprav aminokyselin vypracované ve VÚAB

Rok	Aminokyselina	Producent	
1963	L-lysin	Corynebacterium glutamicum	Hse-
1965	L-glutamová kys.	Corynebacterium glutamicum	
1966	L-ornithin	Corynebacterium glutamicum	Arg-
1968	L-citrullin	Corynebacterium glutamicum	Arg-
1970	L-asparagová kys.	Alcaligenes metalcaligenes	
1971	L-valin	Corynebacterium glutamicum	Ile-
1972	L-tyrosin	Corynebacterium glutamicum	Phe-
1973	D, L-alanin	Corynebacterium glutamicum	Arg-
	L-alanin	Streptomyces coelicolor	
1974	L-homoserin	Corynebacterium glutamicum	Thr-
	L-lysin	Corynebacterium glutamicum	Thrs
1975	L-threonin	Corynebacterium glutamicum	AHVR
	L-tryptofan	Corynebacterium glutamicum	indol ^r
1976	L-lysin	Corynebacterium glutamicum	AEC ^r
1977	L-lysin	Corynebacterium glutamicum	AEC ^r , AHVR
1978	L-lysin	Corynebacterium glutamicum	AEC ^r , Leu-
1979	L-lysin	Corynebacterium glutamicum	AEC ^r , AHVR, AMTM ^r

Arg- — dependence na arginin

Hse- — dependence na homoserin

Ile- — dependence na isoleucin

Leu- — dependence na leucin

Phe- — dependence na fenylalanin

Thr- — dependence na threonin

Thrs — citlivost na threonin

indol^r — rezistence na indolAEC^r — rezistence k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu (analog lysinu)AHVR — rezistence k α -amino- β -hydroxyvalerové kyselině (analog threoninu)AMTM^r — rezistence k 2-amino-3-methylthiomáselné kyselině (analog isoleucinu)

ny za méně než 4 \$/kg, pohybují se ceny výše uvedených aminokyselin v rozmezí 4—20 \$/kg.

Výzkum fermentační přípravy aminokyselin v Československu byl zahájen v r. 1960 ve Výzkumném ústavu antibiotik a biotransformací v Roztokách u Prahy. Dobu téměř 25 let, po kterou se tento výzkum provádí, lze rozdělit do 4 období, časově zhruba odpovídajících pětiletkám. Přehled o vypracovaných technologických aminokyselin s uvedením jejich producentů podává tab. 2 [Plachý 1981].

V prvním období (1960—1965) se výzkum soustředil na vypracování technologie fermentační přípravy lysinu. Z přirozených materiálů se podařilo izolovat kmen rodu *Corynebacterium*, hromadící v médiu významná množství glutamové kyseliny. Byla izolována mutanta tohoto kmenu dependentní na homoserin a hromadící v médiu lysin, s níž byl v podstatě již v r. 1963 vypracován technologický postup, umožňující předání nezbytných podkladů v r. 1965 pro výbudování závodu na výrobu této aminokyseliny.

V druhém období (1966—1970) byly izolovány auxotrofní mutanty rodu *Corynebacterium* a vypracovávány postupy přípravy ornithinu, citrullinu a tyrosinu v laboratorním měřítku a valinu, D, L-alaninu a L-alaninu v poloprovozním měřítku. V tomto období byla také vyvinuta enzymová metoda přípravy asparagové kyseliny z fumarové kyseliny s použitím kmene *Alcaligenes metalcaligenes* jako zdroje aspartasy. Při konverzi 85 % bylo dosaženo produkce až 50 g·l⁻¹ asparagové kyseliny [Plachý a Sikyta, 1977]. Vypracovaná metoda byla koncem let sedmdesátých optimalizována využitím techniky vázaných buněk (čs. pat., 1983), umožňující převést postup do výrobního měřítka.

Třetí období — od r. 1970 do r. 1975 — je charakterizováno jednak návratem k problematice fermentační přípravy lysinu v souvislosti se zahájením výroby této esenciální aminokyseliny v n. p. Biotika, jednak vypracováním přípravy dalších esenciálních aminokyselin, a to tryptofanu v provozním měřítku a threoninu v měřítku laboratorním. Postup přípravy lysinu, při kterém byl potřebný homoserin dodán ve formě kultivační tekutiny po fermentaci producenta homoserinu, byl patentově chráněn [čs. pat., 1982].

Ve čtvrtém období (1976—1980) se výzkum soustředil na fermentační přípravu lysinu s cílem získat nové vyškoprodukční mutanty a vypracovat technologické postupy s použitím netradičních uhlíkatých zdrojů (ethanol, octová kyselina). Byla izolována mutanta druhu *Corynebacterium glutamicum* rezistentní k analogu lysinu, která se stala výchozím organismem při izolaci mutant s více genetickými znaky. Byl také vyvinut postup enzymové přípravy L-lysinu z D, L- α -amino- ϵ -kaprolaktamu s použitím hydrolasy a racemasy [Plháčková et al., 1982].

V současné době je vypracovávána metoda fermentační přípravy threoninu s použitím kmene *Escherichia coli*, získaného metodami genového inženýrství a zakoupeného v SSSR v rámci spolupráce, uskutečňované na základě dvoustranné dohody uzavřené mezi československým Federálním ministerstvem pro technický a investiční rozvoj a Hlavní správou mikrobiologického průmyslu při Radě ministrů SSSR. S použitím tohoto produkčního kmene by mělo být dosaženo 5—10krát vyšších produkcí, než byly zaznamenány s mutantami získanými klasickými metodami mutace a selekce. Kromě přípravy threoninu je také sledována možnost přípravy fenylalaninu enzymovou metodou ze skořicové kyseliny.

Z postupů vypracovaných ve Výzkumném ústavu antibiotik a biotransformací byla v Československu v průmyslovém měřítku realizována pouze fermentační pří-

vinu vyrábí firma Ajinomoto. Na druhém místě je D, L-methionin, vyráběný chemickou syntézou. Jeho největšími výrobci jsou západoněmecká Degussa a francouzská AEC (Alimentation Equilibrée de Commentry). Další aminokyselinou, jejíž roční produkce dosahuje 25 000 tun, z čehož 2/3 produkce připadají na Japonsko, především na firmu Kyowa, je L-lysin, vyráběný převážně fermentační cestou. Vedle této firmy, vyrábějící lysinu i v Mexiku (společnost Albamex), je hlavním výrobcem lysinu Francie, kde se na výrobě podílí společnost Eurolysin, ve které se spojily japonská firma Ajinomoto s francouzskou firmou Orsan a dále firma Rhône-Poulenc. V množství tisíc tun jsou vyráběny glycín (chemickou syntézou) a L-asparagová kyselina (enzymovou metodou s použitím vázaných buněk s aspartasovou aktivitou). Kromě glutamové kyseliny a glycínu, které jsou vyrábě-

prava lysinu. Výroba, zahájená v r. 1971 v n. p. Biotika a dosahující ročního objemu 2 100 tun v r. 1975 a 2 900 tun v r. 1980 má neustálou vzestupnou tendenci. Lysin je vyráběna za cenu srovnatelnou se světovými cenami.

Hledající vhodného producenta glutamové kyseliny, izolovali jsme z půdy, rostlinných materiálů, živočišných zažívacích traktů a exkrementů 12 000 bakteriálních kmenů, z nichž byl vybrán jako nejvhodnější kmen *Corynebacterium sp.* 9366, který byl později identifikován jako druh *Corynebacterium glutamicum*. Tento kmen, dependentní na biotin, hromadil v médiu s glukosou, sójovou moukou a močovinou 30 g.l⁻¹ glutamové kyseliny (Břečka et al., 1964). S produkčním kmenem byl vypracován technologický postup, ověřený v provozním měřítku, kterým bylo dosaženo produkce asi 50 g.l⁻¹ glutamové kyseliny za 60 hodin kultivace. Kmen *Corynebacterium sp.* 9366 byl použit jako výchozí organismus při izolaci mutant dependentních na homoserin a hromadících v médiu lysin. Jako mutagén bylo použito UV-záření a dusíkatého hyperitu; mutanty byly izolovány penicilinovou metodou. Podařilo se izolovat mutantu hromadící v prostředí 20 g.l⁻¹ lysinu (Břečka et al., 1964). Tato mutanta byla využita při vypracovávání technologického postupu fermentační přípravy lysinu, kterým bylo dosahováno v médiu se sacharosou a kukuřičným výluhem produkce až 40 g.l⁻¹.

Kmen *Corynebacterium sp.* 9366 sloužil jako výchozí organismus také při izolaci dalších auxotrofních mutant hromadících se v prostředí aminokyseliny. Při indukcí těchto mutant se z používaných mutagénů jako nejvhodnější osvědčil ethylmethansulfonát, aplikovaný dlouhodobě (optimální dose — 0,05 M, 18 hodin — Nečásek et al., 1967). Byly izolovány mutanty dependentní na arginin a produkující ornithin a citrullin, mutanty dependentní na fenylalanin a syntézující tyrosin, dále mutanty dependentní na isoleucin a hromadící valin a posléze mutanty s neúplným genetickým blokem, stimulovaná v růstu argininem a produkující do média D, L-alanin. (Podařilo se také izolovat kmen *Streptomyces coelicolor*, který v médiu hromadil L-alanin.) Všechny izolované mutanty využívaly glukosu a sacharosu jako zdroje uhlíku a kukuřičný výluh jako komplexní zdroj dusíku, producent valinu rostl a produkoval v médiu s octanem amonném. Výše produkce jednotlivých aminokyselin byla závislá na koncentraci sacharosy a kukuřičného výluhu (Plachý, 1970).

Kromě auxotrofních mutant kmene *Corynebacterium sp.* 9366 byly izolovány také mutanty rezistentní k prekurzorům a analogům aminokyselin. Byla získána mutant rezistentní k indolu, s níž byl vypracován technologický postup přípravy tryptofanu, prodaný ve formě licence do MLR a dále mutant rezistentní k analognu threoninu, tj. k α -amino- β -hydroxyvalerové kyselině (AHV^r), aplikované při přípravě threoninu přímou fermentační metodou, nahrazující prekurzorový postup s použitím homoserinu, produkovánoho mutantou rodu *Corynebacterium* dependentní na threonin. Bylo zjištěno, že produkci tryptofanu ovlivňuje jak dávkování indolu jako prekurzoru, tak hladina růzpuštěného O₂ v médiu. Optimální hladinu lze dosáhnout vhodným dávkováním prekurzoru a úpravou pH. Maximální produkce tryptofanu [10 g.l⁻¹] byly dosaženy za optimálních kultivačních podmínek po 54 hodinách kultivace (čs. pat., 1983).

V průběhu sedmdesátých let byly homoserin-dependentní mutanty produkující lysin nahrazovány postupně mutantami s více genetickými znaky. Nejdříve byla izolována mutant *Corynebacterium glutamicum* rezistentní k analognu lysinu, tj. k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu (AEC^r) a označená *Corynebacterium glutamicum CCM 3287*, s níž byl vypracován technologický postup přípravy lysinu, ověřený v provozním měřítku. Tato technolo-

gie umožňuje dosažení produkce 60 g.l⁻¹ lysinu (čs. pat., 1982). S použitím kmene *C. glutamicum CCM 3287* jako výchozím organismem byly izolovány mutanty současně rezistentní a auxotrofní (např. mutanty AEC^r, Leu^r) a rezistentní k více analogům (např. mutanty AEC^r, AHV^r). Tyto mutanty byly využity při přípravě lysinu v médiích s netradičními zdroji uhlíku, tj. s ethanolém nebo octovou kyselinou. Byla také ověřována možnost aplikace hydrolyzátů dřeva jako uhlíkatých zdrojů. Negativní účinky relativně vysokých koncentrací melasy jako zdroje uhlíku na růst a produkci byly minimalizovány izolací mutant rezistentních k antibiotikům nebo doplněním produkčního média cukernou frakcí melasy zbavenou toxicitních látek. Při studiu náhrady hydrolyzátu arašidové mouky jako komplexního zdroje dusíku bylo zjištěno, že jej lze nahradit hydrolyzátem řepkového nebo lněného šrotu.

V souvislosti s růstem světové populace, ztenčujícími se zdroji bílkovin a se vznikající spotřebou aminokyselin pro medicínské účely lze i v budoucnu v celosvětovém měřítku předpokládat, že porostou roční objemy aminokyselin, připravovaných především fermentační cestou, v míře menší také enzymovými metodami. Tyto vývojové tendenze se projeví i u nás — již dnes dosahuje požadavek naší krmivové základny na roční produkci lysinu 6 000 tun. Kromě lysinu jsou požadovány další esenciální aminokyseliny — threonin, tryptofan, výhledově také isoleucin. Pro potravinářské účely bylo by velmi žádoucí zavedení nového umělého sladiče Usalulu, vyráběného z asparagové kyseliny a fenylalaninu připravených fermentační cestou. Také v medicínské oblasti lze očekávat v budoucnu vznik potřeby čistých aminokyselin pro infúzní roztoky. Tyto vznikající potřeby budou uspokojovány rozvíjením jak vlastních postupů (izolace mutant, náhradní suroviny), tak postupů získávaných na základě spolupráce se zeměmi RVHP, především se Sovětským svazem. Průmyslová příprava aminokyselin, ve světě i u nás, přes všechny problémy a omezení, rázu především ekonomického, je oblastí stále perspektivní, která se bude dynamicky rozvíjet i v budoucnu.

Literatura

- [1] BŘEČKA, A., HEROLD, M., ČERKES, L., PLACHÝ, J., SIKYTA, B.: Sborník VŠCHT, Potravinářská technologie 8, část 3, 1964, s. 21
- [2] HIROSE, Y., OKADA, H. in H. J. PEPPERL, J. PERLMAN (eds.): Microbial Technology, vol. 1, 2nd edn., Academic Press, New York-San Francisco-London, 1979, s. 211
- [3] IZUMI, Y., CHIBATA, I., ITOH, T.: Angew. Chem. 17, 1978, s. 178
- [4] NEČÁSEK, J., PIKÁLEK, P., DROBNÍK, J.: Mutation Res. 4, 1967, s. 409
- [5] PELECHOVÁ, J., PLACHÝ, J., SMĚKAL, F.: Kvas. prům., 27, 1981, s. 64
- [6] PLACHÝ, J.: 1st Internat. Symp. „Genetics of industrial microorganism“, Prague 23–28 August, 1970, Abstracts, s. 206
- [7] PLACHÝ, J., SIKYTA, B.: Folia Microbiol. 22, 1977, s. 410
- [8] PLACHÝ, J.: Biol. listy 46, 1981, s. 181
- [9] PLHÁČKOVÁ, K., VOJTIŠEK, V., PLACHÝ, J.: Folia Microbiol. 27, 1982, s. 382
- [10] —: Akt. Probl. pharm. Ind. 6, 1981, s. 5
- [11] Čs. patent 196 052, 1982
- [12] Čs. patent 196 053, 1982a
- [13] Čs. patent 203 542, 1983
- [14] Čs. patent 209 265, 1983

Plachý, J.: Výzkum a výroba aminokyselin v Československu. Kvas. prům. 30, 1984, č. 9, s. 205–208.

Článek pojednává o historii a dalších perspektivách výzkumu a výroby aminokyselin v Československu. V stručnosti je také uveden přehled o výrobě aminokyselin ve světě.

Плахи, Ю.: Исследование и производство аминокислот в Чехословакии. Квас. прум. 30, 1984, № 9, стр. 205–208.

После сжатой характеристики о состоянии производства аминокислот в мире, статья занимается историей и дальнейшими перспективами исследования и производства аминокислот в Чехословакии.

Plachý, J.: Amino Acids Research and their Production in Czechoslovakia. Kvas. prům., **30**, 1984, No. 9, pp. 205—208.

The article deals with a history and perspectives of a research and a manufacture of amino acids in Cze-

choslovakia. Concise characteristics of the world amino acids production is described, too.

Plachý, J.: Die Erforschung und die Erzeugung von Aminosäuren in der Tschechoslowakei. Kvas. prům., **30**, 1984, No. 9, S. 205—208.

Der Artikel befaßt sich mit der Geschichte und der Perspektive der Erforschung und der Erzeugung von Aminosäuren in der Tschechoslowakei. Es wird auch eine kurze Charakteristik der Erzeugung von Aminosäuren in der Welt erörtert.