

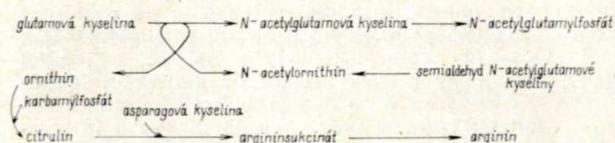
Fermentační příprava ornithinu a citrulinu

579 683

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

Klíčová slova: *Corynebacterium, mutanty auxotrofní na arginin, fermentační příprava, ornithin, citrulin.*

Ornithin a citrulin — intermediáty v biosyntéze argininu — jsou aminokyseliny využívané spolu s argininem k terapeutickým účelům (léčba jaterních onemocnění). Obě aminokyseliny lze připravit fermentačně s použitím auxotrofních mutant hromadících v závislosti na poloze genetického bloku v biosyntetické dráze ornithin (mutanty dependentní na arginin nebo citrulin) nebo citrulin (mutanty vyžadující k růstu arginin). Biosyntéza těchto aminokyselin (obr. 1) vychází z glutamové kyseliny, která je řadou acetylovaných intermediátů přeměňována na N-acetylornithin, který buď může být hydrolyticky rozštěpen v přítomnosti acetylornithasy (*Enterobacteriaceae, Bacillus*) nebo transacetylaza přenese acetyl z N-acetylornithinu na glutamovou kyselinu za vzniku ornithinu (koryneformní baktérie produkující glutamovou kyselinu, *Pseudomonas, Streptomyces, kvasinky*). Hlavními producenty ornithinu a citrulinu jsou arginin vyžadující mutanty druhů *Corynebacterium glutamicum* (Kinoshita et al., 1957; Nakayama a Hagino, 1966) a *Brevibacterium lactofermentum* (Okumura et al., 1968).



Obr. 1. Biosyntéza ornithinu, citrulinu a arginatu u koryneformních baktérií

Kromě fermentační metody byla pro citrulin vypracována také enzymová příprava z arginatu s použitím arginindeiminasy z buněk *Pseudomonas putida* (Kakimoto et al., 1971), jejichž vazeb v polyakrylamidovém gelu byl celý postup kontinualizován (Yamamoto et al., 1974). S cílem vypracovat postup fermentační přípravy ornithinu a citrulinu bylo zjištováno optimální složení médií a optimální podmínky pro kultivaci mutant rodu *Corynebacterium* vyžadujících arginin.

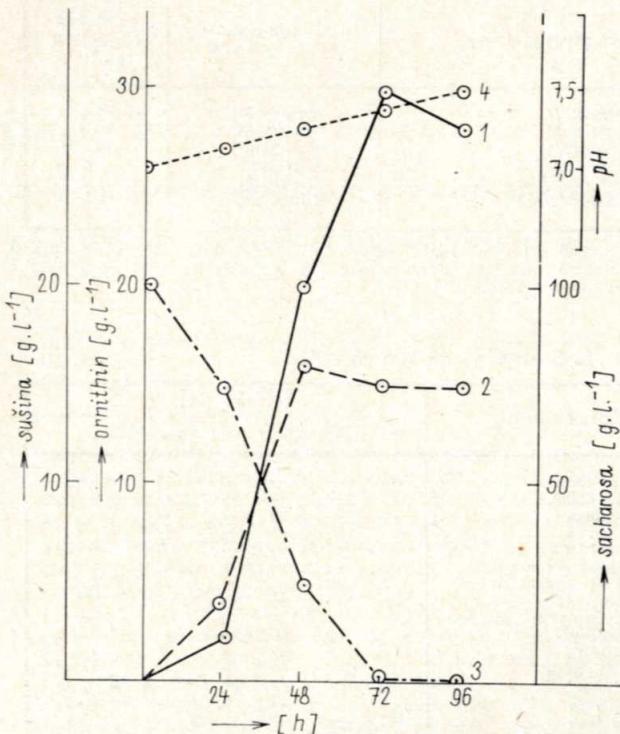
MATERIÁL A METODY

Mikroorganismus: *Corynebacterium sp. 9366-NY/10* dependentní na arginin a citrulin a hromadící v médiu ornithin a *Corynebacterium sp. 9366-EMS/309* dependentní na arginin a hromadící v médiu citrulin.

Média: Složení média S, používaného při produkčním hodnocení mutant, bylo (%): sacharosa — 10, NH₄Cl — 2, K₂HPO₄ — 0,05, KH₂PO₄ — 0,05, MgSO₄ · 7H₂O — 0,01, FeSO₄ · 7H₂O — 0,002, CaCO₃ — 1 (uhličitan sterilován odděleně); L-arginin — 100 µg · l⁻¹, biotin — 10 µg · l⁻¹. Inokulační média SP a C-BG, vybraná jako opti-

mální pro přípravu vegetačních inokul producen-tů ornithinu a citrulinu, měla následující složení (%): médium SP: sacharosa — 2, pepton (Bacto Tryptone Difco) — 1, NaCl — 0,25; médium C-BG: bujón s 2 % glukosy. Jako produkční média při fermentaci ornithinu a citrulinu byla vybrána ze souboru testovaných médií médií M a C tohoto složení (%): médium M: me-lasa — 20, NH₄Cl — 2, K₂HPO₄ — 0,2, kyselý hydrolyzát arašídové mouky — 0,6, CaCO₃ — 2; médium C: glukosa — 1, hydrolyzát kaseinu (Casitone Difco) — 0,1, NH₄Cl — 0,1, kukuřičný výluh (65 % sušiny) — 0,05, močovina — 0,03, K₂HPO₄ — 0,01, MgSO₄ · 7H₂O — 0,0025. pH všech médií bylo 7,0. Všechna média byla sterilována při 120 °C 30 min.

Kultivace: 750 ml Erlenmeyerovy baňky se 60 ml média S byly očkovány testovanými mutantami vyrostlými na masopeptonových šikmých agarech a zaočkované baňky



Obr. 2. Průběh fermentace ornithinu
křivka 1 — ornithin (g · l⁻¹), křivka 2 — sušina (g · l⁻¹), křivka 3 — sacharosa (g · l⁻¹), křivka 4 — pH

byly inkubovány na reciproké třepače při 28 °C (frekvence 1,52 Hz, délka kmitu 90 mm). 500 ml varné baňky se 60 ml médií M nebo C byly očkovány 10% (obj.) 24hodinových inokul kmenů *Corynebacterium sp.* 9366-NY/10 a *Corynebacterium sp.* 9366-EMS/309, vyrostlými v médiu SP nebo C-BG. Zaočkované baňky byly inkubovány na rotační třepače (frekvence otáček — 3,7 Hz, výstředník — 25 mm) při 28 °C 4 dny; pH bylo během fermentace upravováno amoniakem na hodnotu 7,0. Kultivace v 20 l a 200 l fermentačních tancích: tanky byly plněny 10 a 100 l médií, míschaný frekvencí 5,0 Hz, vzdutěný 5 a 50 l vzduchu za minutu (0,5 objemu vzduchu/min/objem média).

Analytické metody: Růst byl sledován vážkovým stanovením sušiny. Přítomnost ornithinu a citrulinu v kultivační tekutině a jejich koncentrace byla zjištěvána semikvantitativní metodou papírové chromatografie, doplněnou denzitometrickým vyhodnocením na Vitatronu TLD-100. Spotřeba sacharidů byla sledována stanovením redukujících sacharidů (Janíček a Hrdlička, 1954). pH bylo měřeno na pH-metru (Laboratorní přístroje, Praha).

VÝSLEDKY

Auxotrofní mutanty kmene *Corynebacterium sp.* 9366, indukované dusíkatým yperitem a ethylmethansulfonátem, dependentní na arginin, byly produkčně hodnoceny v médiu S s cílem zjistit, které aminokyseliny testované mutanty hromadí v médiu. O výsledcích hodnocení informuje tab. 1.

K další práci byla vybrána jako producent ornithinu mutanta *Corynebacterium sp.* 9366-NY/10 a jako producent citrulinu mutanta *Corynebacterium sp.* 9366-EMS/309.

Inokolem produkčních mutant, vyrostlým v inokulačním médiu SP (očkovaným kmenem *Corynebacterium sp.* 9366-NY/10) a v médiu C-BG (očkovaným kmenem *Corynebacterium sp.* 9366-EMS/309), byly očkovány baňky

Tab. 1. Produkce aminokyselin mutantami *Corynebacterium sp.* 9366 dependentními na arginin

Označení mutanty	Produkovaná aminokyselina	Produkce v médiu S (g · l⁻¹)
9366-NY/7	Ornithin ¹⁾	11,5
9366-NY/8	Ornithin ¹⁾	10,0
9366-NY/10	Ornithin ¹⁾	12,0
9366-EMS/253	Citrulin	0,5
9366-EMS/309	Citrulin ²⁾	2,2
9366-EMS/313	Citrulin ²⁾	1,9

1) Kromě ornithinu byl v malých množstvích hromaděn také valin.

2) Kromě citrulinu byly hromaděny v malých množstvích také valin a alanin.

Tab. 2. Složení produkčních médií

Složka média	Médium (%)					
	O	O-H	O-M	C-1	C-3	C-4
Glukosa	—	—	—	10	10	—
Sacharosa	10	10	—	—	—	5
Melasa	—	—	20	—	—	—
Pepton	—	—	—	—	—	0,5
Bacto Casitone Difco	0,5	—	—	—	1	—
Yeast extract Difco	0,5	—	—	1	—	—
Beef extract Difco ¹⁾	—	—	—	—	—	0,5
Corn-steep liquor	0,5	—	—	—	0,5	—
Hydrolyzát arašídové mouky	—	0,5	0,5	—	—	—
NH ₄ Cl	1	2	2	—	1	—
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	—	—	2	—	2
Močovina	0,3	—	—	—	0,3	0,3
KH ₂ PO ₄	—	—	—	0,025	—	0,05
K ₂ HPO ₄	0,1	—	0,2	0,025	—	0,05
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,025	0,03	—	0,1	0,025	0,03
CaCO ₃	1	2	2	3	—	—
FeSO ₄ · 7H ₂ O	—	—	—	—	—	0,001

Všechna média obsahovala jako indikátor pH fenolovou červeň.
1) Obsah sušiny = 65 %.

Tab. 3. Produkce ornithinu a citrulinu dosahované mutantami *Corynebacterium sp.* 9366-NY/10 a *Corynebacterium sp.* 9366-EMS/309 v různých produkčních médiích

Označení média	Růst — sušina (mg · ml⁻¹)	Produkce (g · l⁻¹)	
		Ornithin	Citrulin
O ¹⁾	5,1	2,0	—
O-H	4,6	10,0	—
O-M	4,9	15,0	—
C-1 ¹⁾	4,5	—	2,5
C-3	5,3	—	4,5
C-4	5,0	—	3,5

1) Kontrolní média

Tab. 4. Vliv úpravy pH na výši produkce ornithinu a citrulinu kmeny *Corynebacterium sp.* 9366-NY/10 a *Corynebacterium sp.* 9366-EMS/309

Úprava pH	Produkce (g · l⁻¹)	
	Ornithin	Citrulin
1X za 24 h ve 4hodinových intervalech	25,1 30,4	5,0 10,5

Inokulační média: SP, C-BG.
Produkční média: O-M-1, C-3.

s produkčními médiemi (složení — viz tab. 2), vybranými v orientačních pokusech a po 4denní kultivaci byla zjištována výše produkce ornithinu a citrulinu (tab. 3).

Média O-M a C-3, na nichž se dosáhlo maximálních produkcí ornithinu (15 g · l⁻¹) a citrulinu (4,5 g · l⁻¹), byla použita v další práci. Výsledkem kvalitativního a kvantitativního obměňování média O-M bylo médium O-M-1, na němž se dosáhlo produkcí až 30 g · l⁻¹.

Po zjištění optimálního složení produkčního média byly z kultivačních podmínek ovlivňujících výši produkce sledovány podmínky vzdutěnění a pH. 500 ml varné baňky byly plněny různými objemy médií (50, 60, 80 a 100 ml) a pH bylo upravováno amoniakem na hodnotu 7,0 buď 1X za 24 h nebo ve 4hodinových intervalech po celou dobu fermentace. Zatímco nebyl zaznamenán výraznější vliv různých objemů produkčního média na výši produkce — zvolené podmínky vzdutěnění, tj. plnění baněk 60 ml médií (= kontrola), byly optimální, zajišťující celkem dostatečný přenos kyslíku do kultivační tekutiny, projevil se výrazný vzestup produkce ornithinu a citrulinu vzhodnou úpravou pH, tj. ve 4hodinových intervalech během celé fermentace (tab. 4). Zvláště u citrulinu bylo zvýšení produkce výrazné (více než dvojnásobné).

Produkce ornithinu zaznamenané v baňkách byly již dostatečné k tomu, aby dosažené výsledky byly verifikovány ve větším měřítku a aby byla s kmenem *Corynebacterium sp.* 9366-NY/10 ověřena možnost fermentační přípravy ornithinu. Byly prováděny pokusy v 20 l tancích a v poloprovozních tancích o objemu 200 l. V 20 l tancích se dosáhlo maxima produkce (20–25 g · l⁻¹) v rozmezí 50–70 h fermentace, v 200 l tancích byly maximální produkce (30 g · l⁻¹) zaznamenány v 60 h kultivace. Časový průběh fermentace ornithinu v 200 l tanku, plněném 100 l médiu O-M-1 a zaočkovaném 10% (obj.) inokula kmene *Corynebacterium sp.* 9366-NY/10, je znázorněn na obr. 1.

Po dosažení maxima nárůstu ve 48. hodině se dosáhlo maxima produkce (30 g · l⁻¹) v 72. hodině. Spotřeba sacharosy byla úměrná délce procesu a na konci fermentace neobsahovalo médium již žádný cukr. Hodnoty pH se během fermentace pohybovaly v rozmezí 7,0–7,5.

Ornithin z kultivační tekutiny byl izolován s použitím sulfonovaného katechu S. Ornithin adsorbovaný na katechu byl eluován vodným roztokem amoniaku a eluát po odbarvení aktivním uhlím byl zahuštěn. Z koncentrátu byl získán při účinnosti izolace 60% (počítáno na výchozí fermentační půdu) krystalický ornithin hydrochlorid 100% čistoty.

DISKUSE

Relativně vysokých produkcí ornithinu se doháslo kultivací mutanty rodu *Corynebacterium* dependentní na citrulin nebo arginin. Dosažené výsledky (produkce 30 g.l^{-1} v 60. hodině kultivace) jsou srovnatelné s výsledky, které uvádějí *Kinoshita et al.* (1957) s mutantou *Corynebacterium glutamicum* vyžadující k růstu citrulin. Dependence na citrulin nebo arginin svědčí o lokalizaci genetického bloku v biosyntetické dráze mezi ornithinem a citrulinem. Také hromadění citrulinu mutantou téhož výchozího organismu, vyžadující arginin, tj. kmene rodu *Corynebacterium*, lze srovnat s produkci mutanty *Corynebacterium glutamicum* dependentní na arginin (*Nakayama a Hagine*, 1966), která v médiu s 10 % glukosy hromadila po 4denní kultivaci $10,7 \text{ g.l}^{-1}$ citrulinu.

PODĚKOVÁNÍ

Autor děkuje za spolupráci Dr. L. Čerkesovi a za technickou pomoc J. Hroudové a J. Křivánkové.

Literatura

- [1] JANÍČEK, G. - HRDLIČKA, J.: Listy cukrovarnické, **70**, 1954, s. 27.
- [2] KAKIMOTO, T. - SHIBATANI, T. - NISHIMURA, A. N. - CHIBATA, I.: Appl. Microbiol., **22**, 1971, s. 992.
- [3] KINOSHITA, S. - NAKAYAMA, K. - UDAKA, S.: J. Gen. Appl. Microbiol., **3**, 1957, s. 276.
- [4] NAKAYAMA, K. - HAGINO, H.: Nippon Nogeikagaku Kaishi **40**, 1986, s. 377; Chem. Abstr. **66**, 1967, s. 152p.
- [5] OKUMURA, S. - SHIBUYA, M. - YOSHINAGA, F. - MAEYASHIKI, I. - KONISHI, S.: Jap. pat. 43-8712, 8714, 1968; v „Microbial Production of Amino Acids“ [K. Yamada - S. Kinoshita - T. Tsunoda-K-Aida, eds.], Kodansha, Tokyo; J. Wiley and Sons, New York-London-Sydney-Toronto, 1972, s. 403.
- [6] YAMAMOTO, K. - SATO, T. - TOSA, T. - CHIBATA, I.: Biotech. Bioeng. **26**, 1974, s. 1589.

Plachý, J.: Fermentační příprava ornithinu a citrulinu.
Kvas. prům. **33**, 1987, č. 3, s. 73—75.

S mutantami kmene *Corynebacterium sp. 9366* dependentními na arginin bylo dosaženo v laboratorním měřítku v baňkách po 4denní kultivaci produkce 10 g.l^{-1}

citrulinu a 30 g.l^{-1} ornithinu. Byl vypracován postup fermentační přípravy ornithinu, umožňující dosáhnout při aplikaci média s melasou a hydrolyzátem arašídové mouky produkce 30 g.l^{-1} ornithinu po 60 hodinách kultivace.

Плахи, И.: Приготовление орнитина и цитруллина ферментативным путем. Квас. прум. 33, 1987, № 3, с. 73—75.

С мутантами *Corynebacterium sp. 9366* нуждающимися в аргинине было достигнуто в лабораторном масштабе в колбах продуцций 10 г.л^{-1} цитруллина и 30 г.л^{-1} орнитина в течении 4 суток. Был разработан процесс приготовления орнитина ферментативным путем, при помощи которого было возможно достичь в среде с мелассой и гидролизатом арахисовой муки продукции 30 г.л^{-1} орнитина в течении 60 часов культивации.

Plachý, J.: Ornithine and Citrulline Production by Fermentation. Kvas. prům. **33**, 1987, No. 3, pp. 73—75.

Productions of 10 g.l^{-1} citrulline and 30 g.l^{-1} ornithine were achieved during 96 hours submerged cultivation of auxotrophic mutants of *Corynebacterium sp. 9366* which were dependent to arginine. The ornithine preparation process by a fermentation has been developed. The production of 30 g.l^{-1} ornithine was achieved after 60 hours of the cultivation. The production medium contained molasses and hydrolyzate of peanut meal.

Plachý, J.: Fermentative Produktion der Aminosäuren Ornithin und Citrullin. Kvas. prům. **33**, 1987, Nr. 3, S. 73—75.

Die Produktion der Aminosäuren Ornithin und Citrullin wurde durch Einsatz Arginin-bedürftiger Mutanten erzielt. Die Produktionsparameter waren bei Citrulin 10 g.l^{-1} und bei Ornithin 30 g.l^{-1} nach 96 Stunden Kultivation. Es wurde ein Verfahren der Ornithinherstellung ausgearbeitet. In einem 200-L-Fermentor hat die Mutante nach 60 Stunden Kultivationsdauer 30 g.l^{-1} Ornithin akkumuliert. Das Nährmedium für die Ornithin-Produktion enthält als Kohlenstoffquelle Melasse und als Stickstoffquelle Erdnußmehl.