

# **Speciální fermentační procesy**

## **Účinek povrchově aktivních látok na biosyntézu L-lysinu**

663.15:547.486.4  
661.185.1

RNDr. FRANTIŠEK SMÉKAL, CSc., Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

Ing. JANA PELECHOVÁ, CSc., Ing. BEDŘIŠKA HLADÍKOVÁ, Vysoká škola chemickotechnologická, Praha

Některé poznatky o působení povrchově aktivních látok na bakteriální buňky ukazují na změny v permeabilitě cytoplasmatické membrány, které se mohou uplatňovat jak v transportu živin do buňky, tak v uvolňování látok do prostředí. Pozitivní efekt nepolárních tensidů na produkci extracelulárních metabolitů byl prokázán u producentů L-aminokyselin. U kmene *Brevibacterium sp.* se po přidání tweenu 60 nebo kyseliny olejové zvyšuje produkce kyseliny L-glutamové [1]. Podobně limitované koncentrace penicilinu a sacharosopalmitátu vyvolávají stejný efekt u kmene *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869 [2]. Další typy esterů mastných kyselin s polyalkoholy mají rovněž pozitivní účinek na zvýšenou akumulaci aminokyseliny ve fermentačním médiu [3]. U kmene *Corynebacterium glutamicum* bylo dosaženo zvýšení produkce L-lysinu o 10–20 % po přidání kyseliny olejové a tweenu 80, a to v závislosti na produkční mutantě, koncentraci tensidů a době dávkování v průběhu kultivace [4]. Dále byl prokázán stimulační účinek některých typů polárních tensidů na produkci L-lysinu u kvasinky *Candida pelliculosa*, vyznačující se rezistencí vůči S-aminoethylcysteinu [5]. Cílem práce

bylo sledovat účinek některých typů tensidů na produkci L-lysinu u kmene *Corynebacterium glutamicum* na baňkách v laboratorním měřítku.

### **Materiál a metody**

Pokusy byly prováděny s kmenem *Corynebacterium glutamicum* 544 ze sbírky produkčních mikroorganismů VÚAB Roztoky u Prahy. Genetická charakteristika kmene, udržování a způsob kultivace byly popsány dříve [6]. Použité chemikálie: sodná sůl laurylsulfátu, cetyltrimethylammoniumbromid, tween 60 a 80, triton X-100. Analytické metody a kultivační technika: stanovení L-lysinu, redukujících látok, amoniakálního dusíku, dále složení inokulačního média a fermentačních médií jsou uvedeny v pracích [6, 7]. Složení melasového média: melasa řepná (60 % hm. redukujících látok) 15 g, hydrolyzát arašídové mouky 15 ml, močovina 0,3 g, síran ammonií kryst. 0,5 g, hydrogenfosforečnan draselný kryst. 0,1 g, síran hořečnatý kryst. 0,01 g, uhličitan vápenatý mletý 3 g, voda destilovaná ad 100 ml; pH média 6,8 až 7,0; sterilace 0,12 MPa po dobu 30 min; roztoky tensidů byly sterilovány filtrace s použitím bakteriologických

Tabulka 1. Účinek laurylsulfátu, tweenu 60 a tweenu 80 na produkci L-lysinu u kmene *Corynebacterium*

Koncentrace laurylsulfátu (% hm.)	Produkce L-lysinu g/l média za 72 h
0 (kontrola)	20,8
0,02	14,5
0,04	10,2
0,06	8,0
0,08	6,2
0,10	6,0

  

Koncentrace tweenu 60 (% obj.)	Produkce L-lysinu g/l média za 72 h
0 (kontrola)	19,9
0,1	21,4
0,2	23,8
0,3	25,2
0,4	26,0
0,5	24,0

  

Koncentrace tweenu 80 (% obj.)	Produkce L-lysinu g/l média za 72 h
0 (kontrola)	21,2
0,1	22,4
0,2	22,8
0,3	26,0
0,4	26,5
0,5	25,8

Tabulka 2. Účinek tweenu 60 a tweenu 80 na produkci L-lysinu u kmene *Corynebacterium glutamicum* na melasovém médiu

Koncentrace	Produkce L-lysinu (g/l média za 96 h)	
	tween 60	tween 80
0 (kontrola)	21,8	21,8
0,1	21,9	21,2
0,2	21,6	23,3
0,3	20,0	22,7
0,4	20,0	28,5
0,5	19,9	25,1

filtrů G5. Množství a doba dávkování povrchově aktivních látok jsou uváděny u jednotlivých experimentů.

#### Výsledky a diskuse

Poznatky o stimulačním efektu tensidů na biosyntézu kyseliny L-glutamové u koryneformních baktérií byly podnětem pro sledování těchto biologicky aktivních látok na geneticky odlišně determinované kmeny produkovající L-lysin. Experimenty byly voleny tak, aby povrchově aktivní látky byly přidávány do média po ukončení růstové fáze kultury, tj. ve 24. hodině kultivace. Z polárních tensidů byl aplikován Na-laurylsulfát v koncentracích 0,02—0,1 % hm/ml média, v případě tweenu 60 a tweenu 80 bylo použito množství 0,1—0,5 % obj./ml fermentačního média; při fermentaci na sacharózovém médiu probíhala kultivace po dobu 72 h, při aplikaci melasy jako zdroje uhlíku po dobu 96 h. Účinek obou typů povrchově aktivních látok na biosyntézu L-lysinu u kmene *Corynebacterium glutamicum* je uveden v tabulce 1.

Při použití Na-laurylsulfátu jde o výrazný inhibiční vliv na produkci aminokyseliny ve všech použitých koncentracích tensidu. Naopak u obou typů tweenů byl prokázán stimulační efekt na produkci L-lysinu. Dosahuje se při tom zvýšení produkce o 10—30 % oproti kontrolnímu postupu. Při použití melasy jako zdroje uhlíku byl zjištěn pouze u tweenu 80 stimulační efekt na produkci L-lysinu, a to v koncentracích 0,4 a 0,5 % obj. Oba typy tensidů byly aplikovány ve 30. hodině fermentace, stanovení L-lysinu bylo prováděno v 96. hodině kultivace.

Sledování množství redukujících látok a amoniakálního dusíku na konci fermentace ukázalo nevýrazné rozdíly v utilizaci obou skupin látok jak v kontrolním postupu, tak experimentech po působení tensidů. Zbytková množství redukujících látok a amoniakálního dusíku jsou uvedena v tabulce 3.

Tabulka 3. Stanovení redukujících látok, amoniakálního dusíku a L-lysinu ve fermentačním médiu se sacharózou ve 72. hodině

Typ tensidu	Redukující látky (g/l média)	Amoniak. N (g/l média)	L-lysin (g/l média)
0 (kontrola)	57,0	3,2	19,9
tween 60 [0,4 %]	60,0	2,3	27,7
tween 80 [0,4 %]	50,0	2,2	29,4

Tabulka 4. Účinek cetyltrimethylammoniumbromidu (CMAB) a tritonu X-100 na produkci L-lysinu u kmene *Corynebacterium glutamicum* na sacharózovém médiu

Koncentrace CMAB (% obj.)	Produkce L-lysinu (g/l média za 72 h)
0 (kontrola)	29,5
0,1	6,5
0,2	5,0
0,3	4,7
0,4	4,7
0,5	4,5

  

Koncentrace triton X-100	Produkce L-lysinu (g/l média za 72 h)
0 (kontrola)	30,0
0,1	26,5
0,2	23,1
0,3	21,0
0,4	10,6
0,5	7,0

Dále byl sledován účinek různých koncentrací cetyltrimethylammoniumbromidu (CMAB) a tritonu X-100 na produkci L-lysinu u *Corynebacterium glutamicum* 544 s aplikací ve 24. hodině kultivace. V obou případech byla zjištěna vysoká inhibice syntézy lysinu, jak je zřejmé z tabulky 4.

Předložené výsledky práce ukazují na rozdíly v působení použitých tensidů na produkci L-lysinu u *Corynebacterium glutamicum*. Z ionogenních tensidů se vyznačují negativním účinkem laurylsulfát a CMAB; z nepolárních povrchově aktivních látok byla zjištěna značná

inhibice po aplikaci tritonu X-100; stimulační efekt laurylsulfátu a CMAB byl prokázán v práci [5] v případě syntézy L-lysinu u kvasinky *Candida pelliculosa*. Rozdíly v účinku obou typů tensidů mohou být v souvislosti s jejich působením na odlišné buňky s různým složením buněčné stěny a cytoplasmatické membrány. Pozitivní výsledky v produkci L-lysinu zjištěné po aplikaci tweenu 60 a tweenu 80 jsou analogické zjištěním u geneticky odlišné mutanty *Corynebacterium glutamicum* [4].

Aplikace některých tensidů při fermentaci L-lysinu naznačuje možnost zvýšení produkce této esenciální aminokyseliny při racionálním využití dosavadní koncentrace uhlikatého zdroje ve fermentačním médiu.

#### Literatura

- [1] SHIBUKAWA, M.: Agr. Biol. Chem., **34**, 1970, s. 1136
- [2] Japonský patent, sijis č. 7 917 183, 1979
- [3] TOSAKA, H., HIRAKAWA, K.: Agr. Biol. Chem., **43**, 1979, s. 491
- [4] MARSHAVINA, Z. V.: Priklad. bioch. mikrobiol., **11**, 1975, s. 356
- [5] TAKENOUCHI, S.: Agr. Biol. Chem., **43**, 1979, s. 727
- [6] PELECHOVÁ, J., SMÉKAL, F., BULANT, V., KRUMHANZL, V.: Kvas. prům., **25**, 1979, s. 179
- [7] SMÉKAL, F., PELECHOVÁ, J., KINDLOVÁ, E., KRUMHANZL, V.: Kvas. prům., **26**, 1980, s. 200
- [8] PELECHOVÁ, J., SMÉKAL, F., PLACHÝ, J.: Kvas. prům., **27**, 1981, s. 64

**Smékal, F. - Pelechová, J. - Hladíková, B.: Účinek povrchově aktivních látok na biosyntézu L-lysinu.** Kvas. prům., **28**, 1982, č. 5, s. 108—110.

Byl testován účinek některých typů polárních a ne-polárních tensidů na biosyntézu L-lysinu u kultur *Corynebacterium glutamicum* v produkční fázi kultivace. Povrchově aktivní látky jako Na-laurylsulfát, cetyltrimethylammoniumbromid a triton X-100 působí silně inhibičně na biosyntézu esenciální aminokyseliny; pouze určité koncentrace tweenu 60 a tweenu 80 mají stimulační efekt na produkci L-lysinu při zvýšení výtěžku o 10—30 % proti kontrolnímu postupu.

**Смекал Ф., Пелехова, Я., Гладикова, В.: Действие поверхности-активных веществ на биосинтез L-лизина.** Квас. прум., **28**, 1982, № 5, с. 108—110.

Было проведено испытание действия некоторых ти-

пов полярных и неполярных тензидов на биосинтез L-лизина для культур *Corynebacterium glutamicum* в продуктивной фазе культивирования. Поверхностно-активные вещества как Na-лаврилсульфат, цетилтри-метиламмонийбромид и тритон X-100 оказывают сильное действие в качестве сильных ингибиторов на биосинтез эссенциальной аминокислоты; только определенные концентрации твина 60 и твина 80 дают стимулирующий эффект для продукции L-лизина при повышении выхода на 10—30 % по сравнению с контролем экспериментом.

**Smékal, F. - Pelechová, J. - Hladíková, B.: Effect of Surface Active Agents on Biosynthesis of L-Lysine.** Kvas. prům. **28**, 1982, No. 5, p. 108—110.

The effect of several types of polar and nonpolar tensides on the biosynthesis of L-lysine using the strain *Corynebacterium glutamicum* in the production phase of a cultivation was tested. Surface active agents such as Na-laurylsulphate, cetyltrimethylammonium bromide and Triton X-100 significantly inhibit the biosynthesis of an essential amino acid. Only the definite concentrations of Tween 60 and Tween 80 have a stimulating effect on a production of L-lysine. Using Tween the yields was increased about 10 to 30 %.

**Smékal, F. - Pelechová, J. - Hladíková, B.: Die Auswirkung der oberflächenaktiven Substanzen auf die Biosynthese des L-Lysins.** Kvas. prům. **28**, 1982, No. 5, S. 108—110.

Es wurde die Auswirkung einiger Typen der polaren und nichtpolaren Tenside auf die Biosynthese des L-Lysins bei den Kulturen *Corynebacterium glutamicum* in der Produktionsphase der Kultivation getestet. Die oberflächenaktiven Substanzen wie Na-Laurylsulfat, Cetyltrimethylammoniumbromid und Triton X-100 wirkt auf die Biosynthese der essentiellen Aminosäure stark inhibitory; nur bestimmte Konzentrationen des Tween 60 und Tween 80 wirken sich auf die Produktion des L-Lysins stimulierend aus, und zwar bei einer Ausbeuteerhöhung um 10—30 % gegenüber dem Kontrollverfahren.

#### Optimalizace chladicího zařízení mladiny

Autor úvodem rekapituluje moderní technologické možnosti zpětného získávání tepla. Z ankety vyplynulo, že pouze 67 % pivovarů má v provozu brýdový kondenzátor k regeneraci odpadního tepla ve varně.

V dalším jsou popsány různé způsoby použití brýdového kondenzátoru a bilancovány možnosti zpětného získávání energie. Základním předpokladem zlepšení provozních poměrů na brýdovém kondenzátoru je absolutně bezvzduchový provoz, který vyžaduje splnění tří základních podmínek, a to tlakově těsnou pánev, výparníkový systém i přepínací klapky, dále kondenzátor konstrukčně upraven tak, aby na straně vstupu par byl co možná nejménší odpor při prouďení a konečně vyřazení ventilátoru. Transport par prostých vzdachu, tj. kondenzovatelných bez zbytku, lze zajistit také malým přetlakem ve varně páni a lehkým podtlakem v brýdovém kondenzátoru, vyvolaným kondenzací. Při takovém provozu neodcházejí z kondenzátoru žádné plynné zbytky, ani hydrofilní nebo lipofilní aromatické látky.

BLEWSKI, W.: Optimierung von Würzkuhlanlagen. Mschr. Brauerei, **34**, 1981, č. 11, s. 400—402.

Lhotský

#### Pozorování při mrznutí lahvového piva

Autor sledoval proces při ochlazování piva v teplotním rozmezí od bodu mrazu čisté vody až téměř k úplnému vyrovnaní teploty mezi pokusným objektem (lahvou s pivem) a atmosférou chladicí komory ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Výsledky měření teploty uvnitř stěny láhvě a ve středu láhvě jsou při snižování teploty většinou souhlasné, což poukazuje na nerušený transport tepla kapalinou v těchto časových úsecích. Pouze v úseku, v němž vznikala na vnitřní stěně láhvě stálé silnější vrstva ledu, která představovala odpor roztoucí exponenciálně, se tato vrstva stále rychleji ochlazovala. Celkový průběh teplotní křivky jeví zlom při  $-2.8^{\circ}\text{C}$  (bod mrazu piva) a po dosažení  $-4^{\circ}\text{C}$ , když láhev praskla, projevuje se náhlá změna průběhu křivky.

Kontrola rozmrazeného systému ukázala, že pivo ztratilo původní charakter. Mělo silnou vůni zvětralého piva a zahřátím neposkytlo přijatelný nápoj. Autor to připisuje dlouhodobému styku se vzduchem chladicí komory v prasklé lávici. Vymrznutí části vody a bílkovin nemá podle jeho názoru vliv na charakter piva.

WASMUND, R.: Mschr.: Brauerei, **34**, 1981, č. 11, s. 410—413.  
Lhotský