

Fermentačná výroba kyseliny glutámovej

MÁRIA ŠIMKOVÁ – LENKA ŠPITÁLNÍKOVÁ

Súhrn. Kľúčovým faktorom biotechnológie výroby kyseliny glutámovej je produkčný mikroorganizmus. V priemyselnej praxi sa v zahraničí využívajú mutanty bakteriálnych kmeňov aeróbnych rodov *Brevibacterium* a *Corynebacterium*.

Naše pokusy sme robili s bakteriálnym kmeňom *Corynebacterium glutamicum* CCM 2428 získaným z Čs. zb. mikroorganizmov J. E. Purkyně z Brna, ktorý však nie je vyšľachtený na produkciu kyseliny glutámovej.

V jednotlivých pokusoch sme menili zloženie inokulačnej a fermentačnej pôdy a sledovali nárast biomasy, pH, konverziu C-zdroja, prítomnosť kyseliny glutámovej v jednotlivých fázach vlastnej fermentácie.

Najlepšie výsledky v produkcii kyseliny glutámovej sme dosiahli pri použití melasy ako zdroja uhlíka. Pri použití sacharózy bola produkcia kyseliny glutámovej najnižšia.

Kyselina glutámová zaujíma dôležité miesto v mnohých priemyselných odvetviach. V potravinárskom priemysle sa používa ako chuťová prísada do mrazených a sterilizovaných výrobkov a na zvýšenie trvanlivosti výrobkov. Soli kyseliny glutámovej (sodné, draselné, horečnaté, vápenaté a železnaté) sa používajú vo farmaceutickom priemysle pri výrobe liečiv. V textilnom priemysle polymerizované vlákna glutamanu sa uplatňujú ako náhrada prírodného hodvábu. Kyselina glutámová ako stavebná zložka bielkovín sa zúčastňuje na dýchaní mozgového tkaniva, a preto sa využíva aj v humánnej medicíne pri liečení niektorých duševných ochorení.

Koncom 50. rokov sa podarilo japonským výskumníkom vypracovať postup prípravy kyseliny glutámovej s využitím mikroorganizmov a začať tak éru fermentačnej výroby kyseliny glutámovej. Aminokyseliny boli až do polovice tohto storočia pripravované buď extrakciou hydrolyzátov bielkovín mikrobiálneho, živočíšneho alebo rastlinného pôvodu, buď chemickou syntézou. Kľúčovým faktorom biotechnológie súčasných výrob aminokyselín je pro-

RNDr. Mária Šimková, MUDr. Lenka Špitáľníková, Výskumný ústav potravinársky, Trenčianská 53, 825 09 Bratislava.

dukčný mikroorganizmus, ktorý musí spĺňať podmienku stabilnej extracelulárnej nadprodukcie príslušnej aminokyseliny, a to pri zachovaní ďalších optimálnych vlastností (optimálne rastové požiadavky, optimálna rastová charakteristika, potlačenie extracelulárnej produkcie nežiadúcich látok). Vzhľadom na to, že prirodzené zdroje mikroorganizmov neponúkajú hyperproducentov, je jadrom vývoja týchto technológií príprava hyperprodukčných mutantov [1]. V priemyselnej praxi v zahraničí boli využité mutanty bakteriálnych kmeňov rodov *Brevibacterium* a *Corynebacterium* [2–8].

Materiál a metódy

Pri fermentácii kyseliny glutámovej sme použili zbierkový mikroorganizmus *Corynebacterium glutamicum* CCM 2428 získaný z Československej zbierky mikroorganizmov J. E. Purkyně z Brna. Ako pevnú pôdu na uchovávanie mikroorganizmu sme použili živný agar č. 2 vyrábaný Imunou, n. p., Šaříšské Michaľany. Na pomnoženie kultúry sme použili tekutú inokulačnú pôdu [9], ktorej zloženie je v tabuľke 1. Všetky použité chemikálie boli analyticky čisté.

Tabuľka 1. Zloženie tekutej inokulačnej pôdy (g/l)
Table 1. The composition of liquid inoculation medium

glukóza ¹	20
močovina ²	2
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
KH ₂ PO ₄	2
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,4
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,1
biotin	0,01 mg

1 – glucose, 2 – urea

Mikroorganizmus kultivovaný 24 h pri 30 °C na šikmom agare sme resuspendovali do 50 ml tekutej inokulačnej pôdy. Po 24 h kultivácie na recipročnej trepačke pri 30 °C sme odobrali 10 % tejto suspenzie do fermentačnej pôdy. Získané výsledky z trepačkových pokusov sme overili na sovietskom fermentore FU 61 A so samostatnou riadiacou jednotkou, pomocou ktorej sme sledovali: pH, pO₂, teplotu, prevzdušňovanie a otáčky miešadla.

Počas jednotlivých fermentácií sa odoberali vzorky v určitých časových intervaloch na stanovenie koncentrácie biomasy, pH, redukujúcich cukrov a množstva kyseliny glutámovej [10].

Zloženie fermentačnej pôdy na trepačkové pokusy: KH_2PO_4 1 g K_2HPO_4 1 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 32 g, CaCO_3 32 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, biotín 0,003 mg/l destilovanej vody.

Ako zdroj uhlíka sme použili glukózu 150 g, sacharózu 150 g alebo melasu 300 g/l. Pri použití melasy sme do fermentačnej pôdy nepridali biotín, vzhľadom na jeho obsah v samotnom zdroji.

pH fermentačnej pôdy sme pred sterilizáciou upravili s KOH na hodnotu 7–8. Sterilizovali sme 30 min pri 115 °C.

Zloženie fermentačnej pôdy na pokusy vo fermentore: zdroj uhlíka (glukóza 150 g, sacharóza 150 g, melasa 300 g), KH_2PO_4 1 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 32 g, K_2HPO_4 1 g, CaCO_3 32 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, biotín 0,003 mg/l destilovanej vody. Pri druhej fermentácii vo fermentore sme do fermentačnej pôdy nepridali CaCO_3 a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sme znížili z 32 na 2 g.

Podmienky fermentácie z troch overovacích pokusov sú v tabuľke 2.

T a b u l k a 2. Podmienky fermentácií vo fermentore
T a b l e 2. Fermentation conditions in the fermentor

Fermentácia ¹	I	II	III
Fermentačná pôda ² [l]	3	3	3
Inokulum ³ [l]	0,3	0,3	0,25
Čas fermentácie ⁴ [h]	72	72	72
Teplota ⁵ [°C]	30–31	30–32	30–32
Vzdušnenie [obj/obj/min] ⁶	3/3/min	2,2/3/min	1,8/2,5/min
Otáčky miešadla [ot./min] ⁷	320–336	320–430	320–400
pH	8–6,6	7,2	7,3
Úprava pH ⁸	NaOH	NH_3	NH_3

¹Fermentation; ²Fermentation medium; ³Inoculum; ⁴Fermentation time; ⁵Temperature; ⁶Aeration [vol/vol/min]; ⁷Mixer revolutions [rev/min]; ⁸pH adjustment.

Fermentačnú pôdu sme sterilizovali 30 min pri 115 °C.

Počas fermentácie sme pH upravovali v prvom pokuse s NaOH. V ďalších dvoch sa pH upravovalo automatickým dávkovaním 13 % vodného roztoku amoniaku. Hodnota pH sa tak udržiavala v rozmedzí 7,2–7,3 počas celej fermentácie.

Výsledky a diskusia

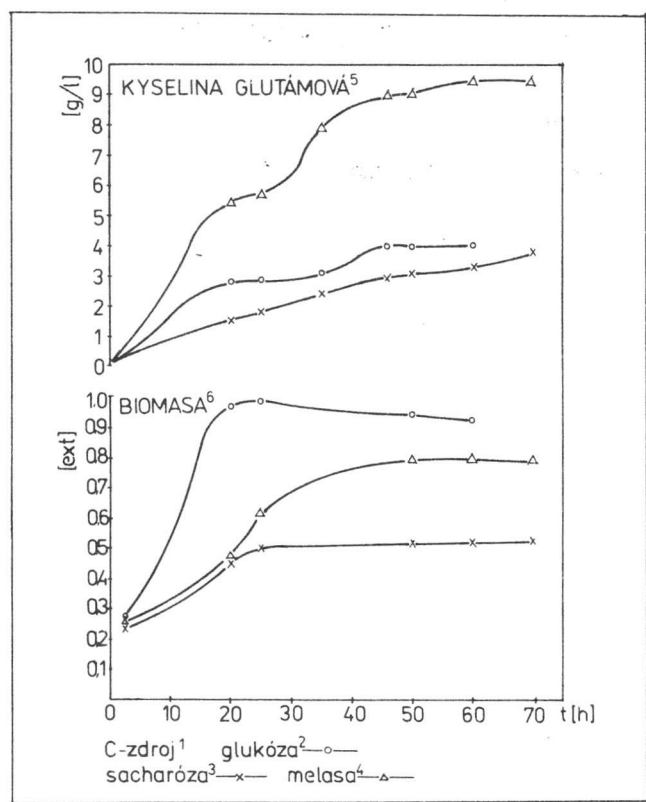
Fermentáciu kyseliny glutámovej sme odskúšali na rôznych zdrojoch uhlíka, na glukóze, sacharóze a melase [11].

Najlepšie výsledky pri produkcii kyseliny glutámovej v trepačkových pokusoch sme dosiahli pri použití melasy. Získali sme vysoký nárast biomasy i produkovanej kyseliny glutámovej. Hodnota pH sa udržiavala počas fermentácie na vyššej úrovni ako pri použití glukózy či sacharózy. Bola v rozmedzí 7,5–6,5 čo má význam najmä pre rozmnoženie mikroorganizmu a produkciu kyseliny glutámovej.

Pri použití sacharózy pH kleslo až na 5,8 a ovplyvnilo nárast biomasy i samotného produktu.

Pri použití glukózy ako zdroja uhlíka sme dosiahli najvyšší nárast biomasy. Produkcia kyseliny glutámovej bola v porovnaní s produkciou na melase nižšia, pH sa udržiavalo na stálej hodnote a neklesalo pod hodnotu 6.

Grafické znázornenie a porovnanie výsledkov v trepačkových pokusoch je na obrázku 1. Pri pokusoch na trepačke sa nedá počas fermentácie plynule



Obr. 1. Priebeh fermentácie kyseliny glutámovej na trepačke.

Fig. 1. Fermentation of glutamic acid in a shaker.

(¹Carbon source; ²Glucose; ³Saccharose; ⁴Molasses; ⁵Glutamic acid; ⁶Biomass.)

udržiavať hodnota pH a hladina O_2 , ktoré sú významné pri náraste biomasy i produkcie kyseliny glutámovej.

Pri fermentačných pokusoch vo fermentore sme použili ako zdroj uhlíka glukózu vo všetkých pokusoch. Začiatočná hodnota pH pri prvom pokuse bola 8. Počas fermentácie pomaly klesala na 6,6. Pokles pH spôsobujú metabolity vznikajúce v priebehu fermentácie. Na úpravu pH sme v tomto pokuse použili NaOH, ktorý sa však neosvedčil.

V ďalších pokusoch sme preto na úpravu pH použili amoniak. Pri prvom pokuse sme dosiahli najvyšší nárast biomasy i produkcie kyseliny glutámovej. V ďalších pokusoch sme taký vysoký nárast biomasy a produkcie kyseliny nezaznamenali. pH sme už udržiavali automaticky pomocou 13 % vodného roztoku čpavku, ktorý zároveň slúžil ako zdroj N. Nedostatok amínodusíka mohol spôsobiť vznik iných kyselín (kys. mliečnej, kys. α -ketoglutarovej) na úkor produkcie kyseliny glutámovej. V dôsledku poklesu nárastu biomasy sme zvýšili otáčky miešadla na hodnotu 430/min a dosiahli tak lepšie okysličenie pôdy.

Na základe dosiahnutých výsledkov i zistených príčin ovplyvňujúcich samotnú fermentáciu uvažujeme o ďalšej optimalizácii technologických parametrov výroby kyseliny glutámovej.

Do redakcie došlo 8. 2. 1989.

Literatúra

1. JIRKŮ, V. PELECHOVÁ, J., KRUMPHANZL, V.: Speciální kvasné výroby, Praha, SNTL 1986
2. Pat. Japonsko 7213, 711
3. Pat. Japonsko 2,497, 232
4. Pat. Japonsko 8265, 198
5. Pat. Japonsko 58, 141, 78 a (83, 141, 789)
6. Pat. Japonsko 58, 141, 788 (83, 141, 788)
7. Pat. Japonsko 117, 740
8. Pat. Japonsko 59, 113, 894 (84,m 113, 894)
9. ROJEKOVÁ, J.: Výskum fermentačnej výroby kyseliny glutámovej. (Výskumná správa.) VÚ LIKO, Bratislava 1972
10. JENDRICHOVSKÁ, M., SABO, B.: Kontrola fermentačnej výroby kyseliny glutámovej. (Výskumná správa.) VÚP, Bratislava 1988.
11. SABO, B., ŠIMKOVÁ, M., ŠPITÁLNÍKOVÁ, L. JENDRICHOVSKÁ, M.: Rozpracovanie technológie a techniky výroby glutamanu sodného (Výskumná správa.) VÚP, Bratislava 1987.

Ферментативное производство глутаминовой кислоты

Резюме

Ключевым фактором биотехнологии производства глутаминовой кислоты является производственный микроорганизм. В промышленной практике в зарубежных странах применяют мутанты бактериальных штаммов аэробных родов *Brevibacterium* и *Corynebacterium*.

Авторы производили опыты с бактериальным штаммом *Corynebacterium glutamicum* CCM 2428, полученный из Чехословацкой коллекции микроорганизмов имени Й. Э. Пуркине из Брна, но которой неселективный для производства глутаминовой кислоты.

В отдельных опытах авторы меняли состав инокуляционной и ферментативной питательной среды и наблюдали за повышением биомассы, pH, конверсией С-источника, присутствием глутаминовой кислоты в отдельных фазах ферментации.

Самые хорошие результаты в производстве глутаминовой кислоты авторы получили применением мелассы – источника углерода. Применением сахарозы было производство глутаминовой кислоты самое низкое.

Fermentation production of glutamic acid

Summary

The productive microorganism is the key factor in the biotechnological production of glutamic acid. In the industrial practice abroad, the mutants of the bacterial strains of aerobic genera *Brevibacterium* and *Corynebacterium* are being used.

Our experiments have been carried out with the bacterial strain *Corynebacterium glutamicum* CCM 2428 obtained from the Czechoslovak Collection of Microorganisms J. E. Purkyně in Brno, which is, however, not bred to glutamic acid production.

In the particular experiments, the compositions of the inoculation and fermentation media have been changed; the biomass growth, pH, conversion of the C-source, presence of glutamic acid in the individual phases of the fermentation have been studied.

The best yields of glutamic acid were achieved with molasses as the C-source. The lowest yield of glutamic acid were found when saccharose was used.