

Příprava L-lysinu s mutantami rodu *Corynebacterium*

RNDr. JIŘÍ PLACHÝ - Ing. STANISLAV ULBERT, Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

Klíčová slova: *Corynebacterium glutamicum*, mutanty rezistentní k chlorkaprolaktamu a chlorlysinu, produkce lysinu

Vhodnými producenty lysinu, aplikovanými při fermentační přípravě, jsou mutanty koryneformních bakterií, především mutanty rodů *Corynebacterium* a *Brevibacterium*. Zprvu používané auxotrofní mutanty byly nahrazeny mutanty regulačními, se změněnými vlastnostmi enzymů, hrajících klíčovou roli v regulaci biosyntézy. Tyto mutanty byly selektovány jako mutanty rezistentní k analogům aminokyselin, tj. látkám strukturou podobným aminokyselinám. Z analogů lysinu se nejvíce osvědčil sirný analog S-/2-aminoethyl-/L-cystein (AEC). Mu-

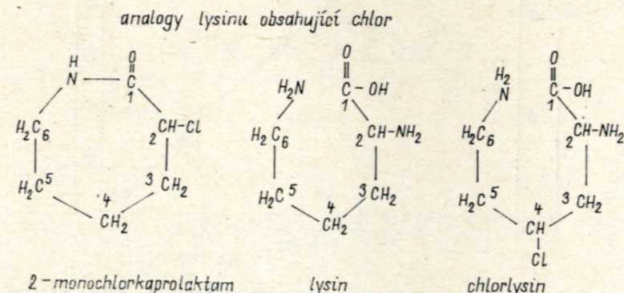
tanty rezistentní k tomuto analogu hromadily v médiu významná množství lysinu (Sano a Shio, 1970). S úspěchem byly také použity analogy lysinu obsahující v molekule chlor, jako např. chlorkaprolaktam [Kubota et al., 1976], představující laktam 2-chlor-6-aminohexakarbonové kyseliny. Jak působí analog lysinu lišící se od lysinu, který je možno považovat za 2,6-diaminohexakarbonovou kyselinu, toliko substitucí vodíku v poloze 4 chlorem, bylo zjišťováno s použitím chlorlysinu [2,6-diamino-4-chlorhexakarbonové kyseliny]. (Struktura těchto analogů je uvedena na obr. 1.)

Cílem práce bylo srovnání účinnosti těchto dvou analogů obsahujících chlor při izolaci rezistentních mutantů *Corynebacterium glutamicum* schopných hromadit v médiu lysin ve významných množstvích.

MATERIÁL A METODY

Mikroorganismus: Jako výchozí organismus pro izolaci mutantů rezistentních k 2-monochlorkaprolaktamu (CHKL^R-mutanty) a k chlorlysinu (CHL^R-mutanty) byla vybrána mutanta *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100 rezistentní k AEC, stimulovaná v růstu homoserinem a produkující lysin [čs. pat., 1982].

Chemikálie: K indukci mutant byl použit ethylmethan-sulfonát fy Koch and Light. Analogy lysinu — 2-monochlorkaprolaktam a chlorlysin — byly syntézovány ve Výzkumném ústavu antibiotik a biotransformací.



Obr. 1. Struktura analogů lysinu obsahujících chlor

Média: Při izolaci mutant bylo použito kompletní (KM) a minimální médium (MM) (Lederberg, 1950). Izolované mutanty byly produkčně hodnoceny v baňkách dvoustupňovou kultivací s použitím inokulačního média CSL-B a produkčního média B tohoto složení: médium CSL-B (%): glukosa — 2, kukuřičný výluh — 1,5; médium B (%): sacharosa — 18, kukuřičný výluh — 1,5, kyselý hydrolyzáta arašidové mouky — 45 (% obj.), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 1, KH_2PO_4 — 0,1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,15, CaCO_3 — 3. Při kultivacích ve fermentačních tancích bylo užito inokulačního média CSL-B-S (%): sacharosa — 2,5, kukuřičný výluh — 4 a produkčního média B-F (%): melasa — 20, kukuřičný výluh — 4, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 2,5, KH_2PO_4 — 0,2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,03. pH všech médií bylo 7,0. Obsah sušiny v kukuřičném výluhu činil 65 %.

Izolace mutant: Buněčná suspenze výchozího kmene, vyrostlá po 18hodinové submerzní kultivaci v KM, byla po promytí fosfátovým pufrům (pH 7,2) vystavena 18hodinovému působení 0,05 M ethylmethansulfonátu. Suspenze po aplikaci mutagenu, promytí a naředění byla očkovaná na plotny s MM doplněné 1 mg/ml 2-monochlorokaprolaktamu (chlorlysinu). Kolonie rezistentních mutant, vyrostlé na plotnách po 3denní inkubaci při 28 °C, byly vyočkovány na šikmé agary.

Kultivace: Mutanty byly produkčně hodnoceny tak, že 24hodinovým inokulem vyrostlým v médiu CSL-B byly očkovány baňky s médiem B a zaočkované baňky byly inkubovány 4 dny. Pro kultivace v laboratorním měřičku byly užity 500 ml varné baňky, plněné 60 ml média CSL-B a 20 ml média B, které byly inkubovány při 28 °C na rotační třepačce (frekvence — 3,7 Hz, výstředník — 25 mm). Kultivace ve fermentačních tancích byly prováděny při 29 °C v 20 l tancích, plněných 10 l média B-F a zaočkovaných 5 % (obj.) 24hodinového inokula, připraveného v baňkách s médiem CSL-B-S; tanky byly míchány frekvencí 6,8 Hz a vzdušněny 5 l/min vzduchu; délka kultivace 5 dní; pH během fermentace udržováno amoniakem na hodnotě 7,0.

Analytické metody: Růst byl zjišťován gravimetrickým stanovením sušiny. Lysin byl stanovován manometrickou metodou s použitím dekarboxylasy lysinu (Gale, 1946). Spotřeba sacharosy byla zjišťována s použitím analyzátoru glukosy Glukose analyzer 2 (Beckman, U. S. A.). pH bylo měřeno pH-metrem OP-208 (Radelkis, Maďarsko).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Při zjišťování citlivosti *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100 k inhibičnímu účinku 2-monochlorokaprolaktamu a chlorlysinu byl sledován relativní růst v přítomnosti 10, 100, 1 000 a 10 000 $\mu\text{g/ml}$ analogů. Růst byl inhibován na 10 % již 100 $\mu\text{g/ml}$, a to jak v případě 2-monochlorokaprolaktamu, tak chlorlysinu. Výchozí organismus je tedy značně citlivý k inhibičnímu účinku zkoušených analogů.

CHKL^R-mutanty a CHL^R-mutanty byly indukovány 18hodinovým působením 0,05 M ethylmethansulfonátu. Tato doze mutagenu se osvědčila jako optimální při izolaci mutant kmene *Corynebacterium* sp. 9366 (Nečásek et al., 1967) a byla s úspěchem použita i při izolaci mutant tohoto kmene produkujících i jiné aminokyseliny než lysin (Plachý, 1975, 1979). Izolované CHKL^R- a CHL^R-mutanty byly podrobeny produkčnímu hodnocení s cílem zjistit, které z nich hromadí v médiu lysin. Výsledky izolace a produkčního hodnocení mutant jsou shrnuty v tab. 1 a 2.

Z celkového počtu 920 testovaných kolonií bylo izolováno 40 CHKL^R-mutant a 39 CHL^R-mutant. Ze 79 izolovaných mutant produkovalo lysin 24 CHKL^R-mutant a 20 CHL^R-mutant. Co se týče počtu izolovaných mutant a

Tab. 2. Izolace CHL^R-mutant *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100 produkujících lysin

Počet otestovaných kolonií	414
Počet izolovaných mutant	39
Procento izolovaných mutant	9,42
Počet CHL ^R -mutant produkujících lysin	20
Procento CHL ^R -mutant produkujících lysin	51,28

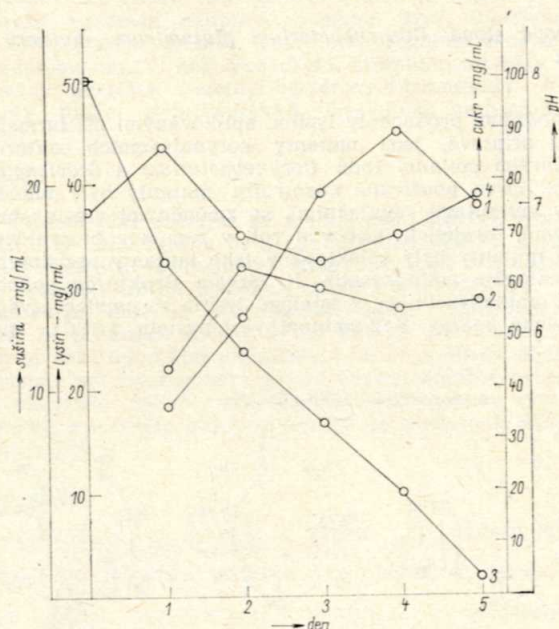
počtu mutant produkujících lysin, nebyl zaznamenán výrazný rozdíl při aplikaci 2-monochlorokaprolaktamu a chlorlysinu.

Z izolovaných mutant produkujících lysin byly vybrány 2 CHKL^R-mutanty a 6 CHL^R-mutant, výrazně převyšujících svou produkci kontrolní výchozí kmen. O produkci těchto mutant informuje tab. 3.

Tab. 3. Produkce lysinu CHKL^R-mutantami a CHL^R-mutantami *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100

Označení mutanty	Produkce 4. dne g/l	% kontroly
C. glutamicum 9366-AEC/100/CHKL-4	31,0	106,90
C. glutamicum 9366-AEC/100/CHKL-30	30,5	105,17
C. glutamicum 9366-AEC/100/CHL-19	31,0	106,90
C. glutamicum 9366-AEC/100/CHL-22	31,5	108,62
C. glutamicum 9366-AEC/100/CHL-23	31,5	108,62
C. glutamicum 9366-AEC/100/CHL-31	31,0	106,90
C. glutamicum 9366-AEC/100/CHL-33	33,0	113,79
C. glutamicum 9366-AEC/100/CHL-37	35,0	120,69
C. glutamicum 9366-AEC/100	29,0	100,00

Jak je zřejmé z tabulky, chlorlysin se osvědčil jako účinnější analog při izolaci mutant s relativně vyšší produkcí lysinu. Maximální produkce byla zaznamenána s mutantou *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100/CHL-37 [35 g/l]. Vyšší účinnost chlorlysinu při selekci producentů lysinu je patrně podmíněna substitucí vodíku



Obr. 2. Kultivace mutanty *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100-CHL-37

Křivka 1 — lysin (mg/ml), křivka 2 — sušina (mg/ml), křivka 3 — cukr (mg/ml), křivka 4 — pH

Tab. 1. Izolace CHKL^R-mutant *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100 produkujících lysin

Počet otestovaných kolonií	506
Počet izolovaných mutant	40
Procento izolovaných mutant	7,91
Počet CHKL ^R -mutant produkujících lysin	24
Procento CHKL ^R -mutant produkujících lysin	60,0

reaktivním chlorem v molekule lišící se od molekuly lysinu toliko touto substitucí.

Mutanta *C. glutamicum* 9366-AEC/100/CHL-37 byla vybrána pro detailnější studium. V měřítku 2 l fermentačních tanků byla touto mutantou ověřena vhodnost produkčního média B—F, v němž sacharosa byla nahrazena melasou a kyselý hydrolyzát arašidové mouky větším množstvím kukuřičného extraktu. V tomto médiu, zaočkovaném inokulem vyrostlým v médiu CSL-B-S, byl sledován průběh kultivace *C. glutamicum* 9366-AEC/100/CHL-37 (obr. 2).

Po maximu nárůstu 2. dne kultivace bylo dosaženo maxima produkce 4. dne, a to 45 g/l lysinu. Cukr byl v průběhu celé kultivace spotřebováván. pH po počátečním vzestupu 1. dne mělo sestupnou tendenci; od 3. dne kultivace nastal vzestup a na konci kultivace dosáhlo pH hodnoty 7,1.

Literatura

- [1] GALE, E. F.: In *Advances in Enzymology* (F. F. Nord, ed.), vol. 24, Interscience Publishers, Inc., New York, 1946, s. 1.
- [2] KUBOTA, K., TOSAKA, O., YOSHIHARA, Y. - HIROSE, Y.: Jap. patent 51-19186, 1976; In Tosaka, O. - Enei, H. - Hirose, Y.: *Trends in Biotechnology*, 1, 1983, s. 70.
- [3] LEDERBERG, J.: *Methods Med. Res.* 3, 1950, s. 5.
- [4] NEČÁSEK, J. - PIKÁLEK, P. - DROBNÍK, J.: *Mutation Res.* 4, 1967, s. 409.
- [5] PLACHÝ, J.: *Folia Microbiol.* 20, 1975, s. 346.
- [6] PLACHÝ, J.: *Folia Microbiol.* 24, 1979, s. 176.
- [7] SANO, K., SHIIO, I.: *J. Gen. Appl. Microbiol.* 16, 1970, s. 373.
- [8] Čs. patent 196 053, 1982.

Plachý, J. - Ulbert, S.: Příprava L-lysinu s mutantami rodu *Corynebacterium*. *Kvas. prům.* 31, 1985, č. 7—8, s. 159—161.

Byla srovnávána účinnost dvou analogů lysinu obsahujících chlor, a to 2-monochlorokaprolaktamu a chlorlysinu — při získávání producentů lysinu. Byla izolována mutanta *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100/CHL-37, rezistentní k chlorlysinu a produkující po čtyřdenní kultivaci v 20 l fermentačních tancích 45 g L-lysinu.

Плахи, Ю., Ульберт, С.: Приготовление L-лизина с мутантами *Corynebacterium*. *Квас. прум.* 31, 1985, № 7—8, стр. 159—161.

Сравнивалась эффективность двух аналогов лизина — хлоркапролактама и хлорлизина — из точки зрения получения штаммов — продуцентов лизина. Удалось получить мутант *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100/CHL-37, который был устойчив к хлорлизину и который способен образовать в ферментере емкостью 20 л после 4 суток культивирования 45/г/л лизина.

Plachý, J. - Ulbert, S.: Preparation of lysine by mutants of *Corynebacterium*. *Kvas. prům.* 31, 1985, No. 7—8, pp. 159—161.

Two lysine analogues containing chlorine (2-monochlorocapro lactam, chlorlysine) were compared from the point of view of their capability to select mutants producing lysine. The mutant *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100/CHL-37 was selected which was resistant to chlorlysine and was able to produce 45 g/l lysine after 4 days cultivation in 20 l fermentor.

Plachý, J. - Ulbert, S.: Die Herstellung von Lysin mit Mutanten von *Corynebacterium*. *Kvas. prům.* 31, 1985, No. 7—8, S. 159—161.

Zwei Analogen von Lysin enthaltenden Chlor (2-Monochlorokaprolaktam, Chlorlysin) wurden von Standpunkt der Gewinnung der Lysinproduzenten vergleicht. Die Mutante *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100/CHL-37 wurde isoliert. Diese Mutante, welche resistent gegenüber Chlorlysin war, hat nach 4 Tagen der Kultivation in 20-l Fermenter 45 g/l-Lysin akkumuliert.