

Produkce L-lysinu u regulačních mutant *Corynebacterium glutamicum*

663.15 547.466.4

RNDr. FRANTIŠEK SMĚKAL, CSc., Ing. STANISLAV ULBERT, RNDr. MIROSLAV BARTA, Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

Klíčová slova: regulační mutanty, *Corynebacterium glutamicum*, biosyntéza L-lysinu, rezistence, zdroj dusíku, zdroj uhlíku

Základní složku fermentačních médií pro biosyntézu L-lysinu představují hydrolyzáty komplexních zdrojů dusíku. Jsou nezbytné pro auxotrofní mutanty kmenů *Corynebacterium* a *Brevibacterium*, které vyžadují k růstu určité aminokyseliny, např. homoserin, treonin, leucin aj. Regulační mutanty produkčních kmenů, které se vyznačují pouze rezistencí na analogy aminokyselin, je možno z hlediska nutričních požadavků považovat za prototrofní mikroorganismy; tyto mutanty produkují L-lysin jak na anorganických zdrojích dusíku, tak na organických substrátech, např. kukuřičném extraktu aj. Pro sledování biosyntézy L-lysinu jsou vhodná semisyntetická média; kombinací obou typů dusíkatých zdrojů v médiu je možno dosáhnout poměrně vysokých produkci aminokyselin. V práci jsou ověřovány produkční vlastnosti mutantních kmenů *Corynebacterium glutamicum*, vyznačující se pouze rezistencí k analogům L-lysinu: S-aminoethyl-L-cystein (kmeny AEC^r) a L-lysinhydroxamát (kmeny LHX^r).

Materiál a metody

V práci bylo použito těchto produkčních mikroorganismů: *Corynebacterium glutamicum* AEC^r, *Corynebacterium glutamicum* LHX^r a *Corynebacterium glutamicum* AEC^r, LHX^r. Kmeny byly udržovány na masopeptonových agarrech, pasážovány po 21 dnech a uchovávány při 5 °C. Složení inokulačního média: sacharosa techn. 30 g, octan sodný 20 g, kukuřičný extrakt 30 g, voda destilovaná ad 1000 ml; pH média je 6,8–7,0; 500 ml varné baňky se plní po 50 ml média a sterilují po dobu 30 min při 0,12 MPa. Po zaočkování se kultivace provádí na rotační třepačce (6,7 Hz) při teplotě 29 °C po dobu 18 až 24 h; vyrostlou kulturou se v množství 10 % obj. zaočkuje 500 ml varné baňky, které obsahují 20 ml fermentačního média tohoto složení: sacharosa techn. 180 g, kukuřičný extrakt (60 % suš.) 15 g, síran amonný kryst. 30 g, hydrogenfosforečnan draselný 1 g, síran hořečnatý kryst. 0,1 g, uhlíkatý vápenatý mikromletý 35 g, voda destilovaná ad 1000 ml; pH média a sterilace jsou stejné jako u inokulačního média; kultivace probíhá na rotační třepačce (6,7 Hz) při teplotě 29 °C po dobu 96 h; pH média se v průběhu kultivace upravuje roztokem 10 % obj. amoniaku na hodnotu 7,0; melasové fermentační médium obsahuje 20 % hmot. řepné melasy a další růstové látky, jak je popsáno výše. Složení acetátového fermentačního média, způsob fermentace, složení dávkovacích směsí a jejich dávkování v průběhu kultivace je popsáno v práci [1]. Metody stanovení dusíku, redukcí látek a L-lysinu jsou uvedeny v publikacích [2, 3]. Fermentační postup přípravy L-lysinu v měřítku laboratorních tanků je popsán v další práci [4].

Výsledky a diskuse

Ověřování produkčních vlastností mutantních kmenů *Corynebacterium glutamicum* bylo prováděno na semisyntetických fermentačních médiích se sacharosou nebo melasou a kombinací dusíkatých zdrojů, tj. amonných solí a kukuřičného extraktu. Fermentace probíhala standardním postupem v baňkách na rotační třepačce při teplotě 29 °C. Produkce L-lysinu u testovaných kmenů po 96 h kultivace ukazuje tabulka 1. Ze zjištěných hodnot vyplývá, že u mutantních kmenů s jedním genetickým znakem jsou produkce aminokyseliny na obou typech médií srovnatelné. U kmene *Corynebacterium glutamicum* AEC^r, LHX^r jsou produkce L-lysinu vyšší, a to na sacharosovém médiu o 16–21 % a v případě melasového média o 52–61 % proti kmenům s jedním genetickým

Tabulka 1 — Biosyntéza L-lysinu u regulačních mutant *Corynebacterium glutamicum* na fermentačních médiích se sacharosou a melasou

Produkční mutanta	Produkce L-lysinu 18% sacharosa	v g. l-1/96 h 23% melasa
<i>Corynebacterium glutamicum</i> AEC ^r	34,6	14,3
<i>Corynebacterium glutamicum</i> LHX ^r	36,2	15,0
<i>Corynebacterium glutamicum</i> AEC LHX ^r	42,0	22,9

znakem. Proto v dalších pokusech byl testován mutantní kmen *Corynebacterium glutamicum* AEC^r, LHX^r.

Byl sledován vliv různých koncentrací kukuřičného extraktu (1,5–4,5 % hmot.) na biosyntézu L-lysinu na sacharosovém (18 % hmot.) a melasovém médiu (20 % hmot.). Tato množství uhlíkových zdrojů byla stejná ve všech variantách pokusů; při aplikaci 1,5 % a 3,0 % hmot. kukuřičného extraktu ve fermentačním médiu se sacharosou jsou produkce L-lysinu stejné, při koncentraci 4,5 % hmot. nastává výrazný pokles produkce aminokyseliny. Pravděpodobně nižší koncentrace kukuřičného extraktu neovlivňují optimální poměry mezi uhlíkem a dusíkem ve fermentačním médiu, které mají základní význam pro optimální průběh biosyntézy aminokyseliny. Tento efekt se zřejmě neuplatňuje na melasových médiích s relativně nízkou koncentrací uhlíkatého zdroje ve fermentačním médiu (asi 10 % hmot. sacharosy). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Vzhledem k nespecifickým nutričním požadavkům regulačních mutant byl u kmene *Corynebacterium glutamicum* AEC^r, LHX^r testován vliv různých organických zdrojů dusíku na produkci L-lysinu. Jak je zřejmé z tabulky 3, jsou produkce L-lysinu na fermentačním médiu

Tabulka 2. Vliv různých koncentrací kukuřičného extraktu v médiu na biosyntézu L-lysinu u kmene *Corynebacterium glutamicum* AEC^r, LHX^r

Kukuřičný extrakt % hmot.	Produkce L-lysinu v g. l-1/96 h	
	18% sacharosa	20% melasa
1,5	41,5	21,8
3,0	39,0	24,0
4,5	31,6	22,5

Tabulka 3. Produkce L-lysinu u kmene *Corynebacterium glutamicum* AEC^r, LHX^r při aplikaci různých zdrojů dusíku ve fermentačním médiu

Zdroj dusíku 2% hmot.	Produkce L-lysinu v g. l-1/96 h
kukuřičný extrakt	36,7
sušená syrovátka	39,3
krmné kvasnice	32,4
pekarské kvasnice	34,0

s kukuřičným extraktem a sušenou syrovátkou prakticky stejné a dosahují hodnot mezi 36,7–39,3 g.l⁻¹ za 96 h kultivace. Určitý pokles v produkci L-lysinu je možno pozorovat při aplikaci krmného a pekařského droždí jako zdrojů dusíku ve fermentačním médiu. Pravděpodobnou negativní roli mají v tomto případě vyšší koncentrace fosfátových iontů obsažené v kvasničné biomase.

Jednou z důležitých vlastností produkčních kmenů je hodnota konverze uhlíkatého zdroje na konečný produkt. U mutantního kmene *Corynebacterium glutamicum* AEC^r, LHX^r byly ověřovány konverze na fermentačním médiu s různými koncentracemi sacharosy v rozmezí 10–18 % hmot. Optimálních konverzí mezi 24–25 % bylo dosaženo při aplikaci 12–15 % hmot. sacharosy při lysinové produkci 30–37 g.l⁻¹ za 96 h kultivace. Nízkých konverzí (18 %) bylo dosaženo při aplikaci 10 % hmot. sacharosy a 21 % konverze na fermentačním médiu s 18 % hmot. sacharosy. Výsledky pokusů jsou shrnuty v tabulce 4.

Tabulka 4. — Vliv různých koncentrací sacharosy ve fermentačním médiu na produkci L-lysinu a konverzi C-zdroje u kmene *Corynebacterium glutamicum* AEC^r, LHX^r

% hmot. sacharosy v médiu	Produkce L-lysinu v g.l ⁻¹ /96 h	% konverze C zdroje
10	18,0	18
12	30,0	25
15	37,1	24
18	38,6	21

V dalších pokusech byla sledována schopnost výše uvedeného produkčního kmene syntetizovat L-lysin na fermentačním médiu s acetátem jako hlavním zdrojem uhlíku. Výsledky pokusů uvedených v tabulce 5 ukazují na malé rozdíly v produkci L-lysinu vzhledem k množství dávkovaných uhlíkatých směsí v průběhu kultivace. Optimální produkce L-lysinu činí 26,5 g.l⁻¹ za 96 h kultivace a odpovídá dosaženým výsledkům produkce na melasovém fermentačním médiu.

Tabulka 5. Produkce L-lysinu u kmene *Corynebacterium glutamicum* AEC^r, LHX^r na fermentačním acetátovém médiu s dávkováním acetát-sacharosové směsi v průběhu kultivace

Množství směsi (ml) a 6 h intervaly	Produkce L-lysinu v g.l ⁻¹ /96 h
0,5	22,1
1,0	26,5
1,5	22,0

Tabulka 6. Produkce L-lysinu na sacharosovém médiu v měřítu laboratorních 21 fermentačních tanků u kmene *Corynebacterium glutamicum* AEC^r, LHX^r

Fermentační pokus (5 laboratorních tanků)	Průměrná produkce L-lysinu v g.l ⁻¹ /96 h kultivace
I.	42,1
II.	38,8
III.	43,5

Základní laboratorní předpis pro biosyntézu L-lysinu u kmene *Corynebacterium glutamicum* AEC^r, LHX^r byl ověřován v měřítu dvojitých laboratorních tanků. Výsledkem standardního fermentačního postupu byla produkce L-lysinu v množství 36,8–43,5 g.l⁻¹ za 96 h

kultivace. Dosažené hodnoty produkci L-lysinu u uvedeného kmene odpovídají biosyntéze L-lysinu u regulačních a současně auxotrofních mutant *Corynebacterium glutamicum*, jak popisuje zahraniční patentová literatura [5]. Regulační mutanty kmene *Corynebacterium glutamicum* jsou vhodným modelem pro další genetické práce s perspektivou jejich využití při ekonomizaci výroby L-lysinu v průmyslovém měřítku.

Literatura

- [1] SMÉKAL, F., KUČEROVÁ, H., ULBERT, S.: Čs. autorské osvědčení č. 195 522, 1979
- [2] SMÉKAL, F., PELECHOVÁ, J., KRUMPHANZL, V.: Kvas. prům., 27, 1981, s. 276
- [3] BULANT, V., BULANTOVÁ, H., SMÉKAL, F.: Proceed. „Heyrovsky Memorial Congress on Polarography“ Part II, Praha 1980, s. 26
- [4] PELECHOVÁ, J., SMÉKAL, F., KOURA, V., KRUMPHANZL, V.: Fol. Microbiol., 25, 1980, s. 341
- [5] Švýcarský patent. spis č. 535 831, 1973

Smékal, F. - Ulbert, S. - Bárta, M.: Produkce L-lysinu u regulačních mutant *Corynebacterium glutamicum*. Kvas. prům., 31, 1985, č. 12, s. 282–283.

Byla studována biosyntéza L-lysinu u regulačních mutant *Corynebacterium glutamicum* s rezistencemi pouze k analogům lysinu. Jako zdrojů dusíku byly použity kombinace anorganických a organických dusíkatých látek (kukuřičný extrakt, syrovátka, krmné a pekařské kvasinky), jako zdroje uhlíku sacharosa, melasa a kyselina octová. Produkce L-lysinu u regulační mutanty *Corynebacterium glutamicum* AEC^r, LHX^r dosahuje hodnot 40 až 43 g.l⁻¹ za 96 h fermentace.

Смекал, Ф., Ульберт, С., Барта, М.: Продукция L-лизина регулирующими мутантами *Corynebacterium glutamicum*. Квас. прум. 31, 1985, № 12, стр. 282–283.

Исследовалась биосинтез L-лизина регулирующими мутантами *Corynebacterium glutamicum* с резистентностью только в отношении к аналогам лизина. В качестве источника азота были применены комбинации неорганических и органических азотосодержащих веществ (кукурузный экстракт, сыворотка, кормовые и хлебопекарные дрожжи), в качестве источника углерода — сахароза, меласса и уксусная кислота. Продукция L-лизина регулирующей мутантой *Corynebacterium glutamicum* AEC^r, LHX^r достигает величин 40–43 г.l⁻¹ за 96 часов процесса ферментации.

Smékal, F. - Ulbert, S. - Bárta, M.: L-Lysine Production with Regular Mutants of *Corynebacterium glutamicum*. Kvas. prům. 31, 1985, No. 12, pp. 282–283.

The biosynthesis of L-lysine was studied with regular mutants of *Corynebacterium glutamicum* having the only resistance to analogs of lysine. As the N-sources combinations of inorganic and organic nitrogen compounds (corn steep liquor, whey, fodder and baker's yeasts) were used. As the C-sources saccharose, molasses and acetic acids were used. The L-lysine production with the regular mutant of *Corynebacterium glutamicum* AEC^r, LHX^r reaches the values of 40 to 43 g.l⁻¹ after 96 h of the fermentation.

Smékal, F. - Ulbert, S. - Bárta, M.: Produktion des L-Lysins bei Regulationsmutanten von *Corynebacterium glutamicum*. Kvas. prům. 31, 1985, Nr. 12, S. 282–283.

Die Autoren studierten die Biosynthese des L-Lysins bei Regulationsmutanten von *Corynebacterium glutamicum* mit Resistenzen nur zu Lysin-Analogen. Als Stickstoffquellen wurden Kombinationen anorganischer und organischer stickstoffhaltiger Substanzen (Mais-extrakt, Molke, Futter- und Backhefe) angewendet, als Kohlenstoffquellen Saccharose, Melasse und Essigsäure. Die Produktion des L-Lysins bei der Regulationsmutante *Corynebacterium glutamicum* AEC^r, LHX^r erreicht Werte von 40–43 g.l⁻¹ nach 96 Stunden Fermentation.