

Biosyntéza L-lysinu u chlorrezistentních mutant *Corynebacterium* sp.

635.15 547.466.4

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

Klíčová slova: biosyntéza L-lysinu, mutanty *Corynebacterium* sp., AEC^r, CHL^r, poměr C:N ve fermentačním médiu, konverze

Významnou skupinou bakteriálních kmenů, které produkují L-lysin, jsou mutanty kmenů *Corynebacterium glutamicum* a *Brevibacterium flavum* s indukovanou rezistencí na různé analogy L-aminokyselin; jsou to např.: S-aminoethyl-L-cystein (AEC), L-lysinhydroxamát (LHX), aminohydroxyvalerová kyselina (AHV), aminomethylthiomásečná kyselina (AMTB) apod. Byly popsány regulační kmeny *Corynebacterium glutamicum* s rezistencí na jeden analog a vícenásobné mutanty s významnou produkcí L-lysinu [1]. V práci byly sledovány fyziologické parametry biosyntézy L-lysinu u mutantních kmenů *Corynebacterium* sp., s rezistencí jednak k AEC a současně k dalšímu strukturálnímu analogu L-lysinu — jeho chlorderivátu. Z připravených chlorrezistentních mutant byly testovány kmeny *Corynebacterium* sp. AEC/100/CHL-22 a *Corynebacterium* sp. AEC/100/CHL-37 se zaměřením na různé poměry zdrojů uhlíku a dusíku ve fermentačních médiích, celkovou konverzi a produkci L-lysinu.

Materiál a metody

V pokusech se použilo těchto produkčních kmenů: *Corynebacterium* sp. AEC/100, *Corynebact.* sp. AEC/100/CHL-22, *Corynebact.* sp. AEC/100/CHL-37, dále *Brevibacterium flavum*, hom⁻, AEC^r, *Corynebact.* *glutamicum* AEC^r, LHX^r a sbírkový kmen *Corynebact.* *glutamicum* ATCC 13 287. Kmeny byly udržovány na MPA agarech a pasážovány po 21 dnech. Složení testovacího média B: sacharosa 180 g, kukuřičný extrakt (60 % suš.) 15 g, hydrolyzát arašídové mouky 450 ml, síran amonný 10 g, dihydrogenfosforečnan draselný 1 g, síran hořečnatý kryst. 0,15 g, uhlíčan vápenatý mletý 30 g, voda dest. ad 1000 ml; pH média 7,0. Složení dalších typů fermentačních médií se sacharosou a melasou bylo popsáno v dřívějších pracích [2]; fermentace probíhala na rotační třepačce (frekvence otáčení kolem 220 . min⁻¹) při kultivační teplotě 29 °C. L-lysin byl stanovován oscilopolarograficky [3], redukující sacharidy enzymaticky na automatickém analyzátoru [4]; varianty různých poměrů uhlíkatého a dusíkatého zdroje ve fermentačních médiích se uvádějí v experimentální části práce.

Výsledky a diskuse

Z mutantních kmenů s rezistencí na chlorlysin byly testovány *Corynebacterium* sp. AEC/100/CHL-22 a *Corynebacterium* sp. AEC/100/CHL-37. Jako kontrola byla použita mutanta *Corynebacterium* sp. AEC/100. Na testovacím fermentačním médiu B bylo v laboratorním měřítku v baňkách dosaženo těchto produkci L-lysinu (g . l⁻¹): u kontrolního kmene 29 g, u mutanty CHL-22 31,5 g a u mutanty CHL-37 bylo dosaženo produkce 35 g za 96 hodin kultivace. Na fermentačním médiu s upraveným

poměrem C:N byly prokázány relativně vyšší produkce a určité rozdíly mezi kmeny; u mutanty CHL-22 byla vyšší produkce na melasovém médiu a naopak vyšší produkce u mutanty CHL-37 při aplikaci sacharosového média. Produkční vlastnosti obou mutant byly porovnávány s kmenem *Brevibacterium flavum*, hom⁻, AEC^r. Výsledky uvádí tabulka 1. Další experimenty byly zaměřeny na sledování biosyntézy L-lysinu u mutanty *Corynebacterium* sp. AEC/100/CHL-22 na šesti typech fermentačních médií s kombinovanými poměry uhlíkatého a dusíkatého zdroje. Analytická zjištění ukázala, že s klesající koncentrací sacharosy na počátku fermentace a s konstantním zdrojem dusíku se snižuje rychlost utilizace uhlíkatého zdroje, relativně se zvyšuje tvorba biomasy a produkce L-lysinu, a to ve 24. hodině kultivace; současně je také pozitivně ovlivněna konverze ve stejné době

Tabulka 1. Produkce L-lysinu u mutant *Corynebacterium* sp. a *Brevibacterium flavum* na fermentačních médiích se sacharosou a melasou

Produkční mutant	Produkce lysinu v g . l ⁻¹ Konverze za 96 hodin kultivace %			
	20 % sacharosa	20 % melasa	sacharosa	melasa
<i>Corynebact.</i> sp. AEC/100/CHL-22	40,5	33,9	26	34
<i>Corynebact.</i> sp. AEC/100/CHL-37	47,2	28,0	27	48
<i>Brevibact. flavum</i> , hom ⁻ , AEC ^r	50,6	37,5	29	37

Tabulka 2. Utilizace sacharosy, množství biomasy, produkce L-lysinu a konverze ve 24. hodině kultivace mutanty *Corynebact.* sp. AEC/100/CHL-22 na fermentačních médiích s různými variantami poměru C : N

Zdroj C [% hmot.]	Zdroj N [% obj.]	Spotřeba C ve 24 . h [mg . ml ⁻¹]	Biomasa 24 h [% obj.]	Produkce L-lysinu 24 h [mg . ml ⁻¹]	Konverze 24 h [%]
30	15	70	13	9,2	13
25	15	47	13	10,9	21
20	15	40	15	13,0	32
30	20	82	12	9,2	11
25	20	50	14	12,5	25
20	20	50	14	13,2	26

kultivace. Ukazuje se, že vysoké koncentrace sacharosy ve fermentačním médiu se nepříznivě projevují tím, že snižují tvorbu biomasy a mohou ovlivnit mechanismus biosyntézy L-lysinu. Použití koncentrace zdroje dusíku se uplatňují méně významně v průběhu fermentace. Výsledky této varianty pokusů uvádí tabulka 2.

Platnost uvedených zjištění, tj. rychlost utilizace uhlíkatého zdroje a další parametry, byla také ověřována u mutanty *Brevibacterium flavum*, *hom-*, *AEC^r*. V těchto pokusech byly použity další tři varianty fermentačních médií s konstantní koncentrací dusíkatého zdroje; jako srovnávací kmen byla použita mutanta *Corynebacterium sp. AEC/100/CHL-22*. Výsledky pokusů uvedené v tabulce 3 ukazují, že rovněž u mutanty *Brevibacterium flavum*

Tabulka 3. Utilizace sacharosy, množství biomasy, produkce L-lysinu a konverze ve 24. hodině kultivace u mutant *Brevibacterium flavum* a *Corynebacterium sp.* na fermentačních médiích s různou koncentrací zdroje C a standardním množstvím zdroje dusíku

Mutanta	Zdroj C [% hmot.]	Zdroj N [% obj.]	Spotřeba C ve 24. h [mg . ml ⁻¹]	Biomasa 24 h [% obj.]	Produkce lysinu 24 h [mg . ml ⁻¹]	Konverze [%] 24 h
<i>Brevibact. flavum</i> <i>hom-</i> , <i>AEC^r</i>	20 15 10	15 15 15	57 41 43	10 11 14	10,0 10,2 11,6	16 25 29
<i>Corynebact. sp. AEC/100 CHL-22</i>	20 15 10	15 15 15	61 44 46	14 15 15	11,7 13,4 15,2	19 33 38

Tabulka 4. Utilizace sacharosy, množství biomasy, produkce L-lysinu a konverze u různých typů mutantních kmenů na fermentačním médiu s optimálním poměrem C : N

Produkční	Spotřeba C ve 24. h [mg . ml ⁻¹]	Biomasa 24 h [% obj.]	Produkce lysinu 24 h [mg . ml ⁻¹]	Konverze 24 h [%]
<i>Brevibact. flavum</i> <i>hom-</i> , <i>AEC^r</i>	49	15	18,2	36
<i>Corynebact. sp. AEC/100/CHL-22</i>	50	15	16,2	32
<i>Corynebact. sp. AEC/100/CHL-37</i>	46	13	15,0	37
<i>Corynebact. glutamicum ATCC 13 287</i>	76	21	10,5	15

se zvyšuje konverze uhlíkatého zdroje tak, jak klesá koncentrace sacharosy ve fermentačním médiu na počátku kultivace; rovněž tvorba biomasy ve 24. hodině kultivace je stejně ovlivněna u kmene *Brevibacterium flavum*. Podobně je ovlivněna i rychlost utilizace sacharosy z fermentačního média. Na základě zjištěných fyziologických hodnot bylo vypracováno složení fermentačního média s optimálním poměrem C:N, který je rozhodujícím faktorem pro produkci L-lysinu. Fermentační postup se ověřoval jednak s vysokoprodukčními mutan-
ty *Brevibacterium flavum* a *Corynebacterium sp.* a dále se sbírkovým kmenem *Corynebacterium glutamicum ATCC 13 287*. Jak vyplývá z tabulky 4, jsou zřetelné rozdíly ve spotřebách sacharosy, množství biomasy, produkci L-lysinu a konverzi ve 24. hodině kultivace. U vysokoprodukčních mutant se spotřeba sacharosy pohybuje kolem 50 % původního množství, zatímco u sbírkového kmene dosahuje až 75 %. Velmi výrazný je rozdíl ve vyšší konverze mezi skupinou vysokoprodukčních mutant a sbírkovým kmenem.
Optimalizace poměrů C:N ve fermentačním médiu na počátku kultivace se pozitivně projevuje v celkové pro-

Tabulka 5. Produkce L-lysinu u mutant *Brevibacterium flavum*, *Corynebacterium glutamicum* a *Corynebacterium sp.* za 96 hodin kultivace

Produkční mutanta	Produkce L-lysinu [g . l ⁻¹]/96 h	Konverze [%]
<i>Brevibacterium flavum</i> , <i>hom-</i> , <i>AEC^r</i>	(1)	43—44
<i>Corynebacterium sp. AEC/100/CHL-22</i>	(2)	40—45
<i>Corynebacterium sp. AEC/100/CHL-37</i>	(3)	46—51
<i>Corynebacterium glutamicum</i> , <i>AEC^r</i> <i>LHX</i>	(4)	32—34
<i>Corynebacterium glutamicum ATCC 13 287</i>	(5)	17

dukci L-lysinu a konverzi při standardní době fermentace, tj. 96 hodin. Prokázaly to pokusy s vysokoprodukčními mutan-
ty [1, 2, 3], dále středně produkční mutantou [4] a opět sbírkovým kmenem *Corynebacterium glutamicum ATCC 13 287* [5]. Hodnoty produkci L-lysinu a průměrné konverze jsou uvedeny v tabulce 5.
Výsledky naznačují možnost využití fyziologických poznatků a vlastností produkčních kmenů pro vypracování technologických postupů fermentační přípravy L-lysinu i v dalších fermentačních stupních.

Literatura

[1] SMĚKAL, F., ULBERT, S., BÁRTA, M.: Kvas. prům., 31, 1985, s. 282.
[2] SMĚKAL, F., BULANT, V., KINDLOVÁ, E., ULBERT, S.: Kvas. prům., 28, 1982, s. 39.
[3] BULANT, V., BULANTOVÁ, H., SMĚKAL, F.: „Heyrovsky Memorial Congress on Polarography“, Part II, Praha 1980, s. 26.
[4] Firemní literatura Boehringer AG.

Směkal, F. - Plachý, J. - Ulbert, S. - Bárta, M.: Biosyntéza L-lysinu u chlorrezistentních mutant *Corynebacterium sp.* Kvas. prům. 32, 1986, č. 7—8, s. 180—181.

Mutantní kmeny *Corynebacterium sp.* s rezistencí na S-aminoethyl-L-cystein a chlorlysin hromadí ve fermentačním médiu s optimálními poměry C:N L-lysin v množství 40—50 g.l⁻¹ za 96 hodin kultivace s konverzí mezi 42—48 %.

Смекал, Ф., Плахи, И., Ульберт, С., Барта, М.: Биосинтез Л-лизина хлоррезистентными мутантами *Corynebacterium sp.* Квас. прум. 32, 1986, № 7—8, стр. 180—181.

Mutantní štammy *Corynebacterium sp.* стойки в отношении к S-амино-этил-L-цистеину и хлорлизину накапливают в культуральной среде с оптимальными соотношениями Л-лизин количеством 40—50 г.л⁻¹ в течение 96 часов культивирования с конверсией 42—48 %.

Směkal, F. - Plachý, J. - Ulbert, S. - Bárta, M.: L-Lysine Biosynthesis with Chlor-Resistant Mutants of *Corynebacterium sp.* Kvas. prům. 32, 1986, No. 7—8 pp. 180—181.

The mutant strains of *Corynebacterium sp.* with the resistance to S-amino-ethyl-L-cysteine and chlorlysine accumulate L-lysine in the quantity of 40 to 50 g.l⁻¹ during 96 h of the cultivation with the conversion between 42 and 48 % when the cultivation medium has the optimum C: N ratio.

Směkal, F. - Plachý, J. - Ulbert, S. - Bárta, M.: Biosynthese des L-Lysins bei chlorresistenten Mutanten von *Corynebacterium sp.* Kvas. prům. 32, 1986, Nr. 7—8, S. 180—181.

Mutante Stämme von *Corynebacterium sp.* mit Resistenz gegen S-Amino-Äthyl-L-Cystein und Chlorlysin häufen in Fermentations-Medien mit optimalen C:N-Verhältnissen des L-Lysin in Mengen von 40—50 g.l⁻¹ während 96-stündiger Kultivierung mit der Konversion zwischen 42—48 % an.