

Kmen *E. coli* ML 30 se zvýšenou produkcí amylomaltasy

RNDr. EVA STEJSKALOVÁ, RNDr. EMILIE PAVLASOVÁ, CSc., RNDr. BOHUMIL SIKYTA, DrSc., Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha

663.15 664.162 579

Klíčová slova: *enzym, nadprodukce, hyperprodukční mutanty, selekce, chemostat*

V současné době se prakticky všechny enzymy získávají z přirozených zdrojů. Kromě zdrojů rostlinného a živočišného původu jsou to zejména mikroorganismy, které se v poslední době jeví jako výhodný zdroj enzymů. Důvodem je možnost zvládnutí průmyslových fermentací mikroorganismů, což dává perspektivu výroby enzymů ve velkém měřítku a není zanedbatelná ani eko-

nomika těchto výrob ve srovnání se získáváním enzymů z jiných zdrojů.

Důležitým faktorem je však dostatečně vysoká produkční schopnost mikroorganismů pro jednotlivé enzymy. Většina průmyslově významných enzymů je syntetizována u mikroorganismů induktivně. To znamená, že v nepřítomnosti induktorů je syntéza enzymů reprimována.

vána specifickými represory. Přidáním vhodného induktoru lze zvýšit syntézu až o tři řády. Kromě této regulace se v řadě případů uplatňuje i inhibice syntézy enzymu; konečným produktem jeho činnosti a tedy odebráním tohoto produktu z kultury lze též podstatně zvýšit produkci příslušného enzymu. Dalším regulačním mechanismem syntézy některých enzymů je tzv. katabolická represe, způsobovaná rychle utilizovatelným uhlíkatým zdrojem, na kterém mikroorganismus roste. Tedy volbou vhodného uhlíkatého zdroje lze tuto represu snížit nebo zcela odstranit. Kromě těchto obecných regulačních mechanismů se u jednotlivých enzymů uplatňují i zcela specifické faktory, které do značné míry ovlivňují syntézu toho kterého enzymu [1, 2].

Ovlivnění syntézy enzymů vnějšími faktory má však poměrně úzké hranice, které lze jen obtížně překročit. Proto za daleko významnější faktor pro zvýšení produkce enzymů se považuje změna genetického vybavení buňky, které jejich syntézu řídí.

Jedním z klasických způsobů je využití mutací ať již spontánních nebo indukovaných příslušnými mutageny. Mutace vedoucí ke zvýšení produkce enzymů mohou být v regulačném genu příslušného operonu a výsledkem je tzv. konstitutivní syntéza enzymu i za nepřítomnosti induktoru. Mutací lze získat i kmeny rezistentní k feedbackové a katabolické represí a mnoho dalších specifických mutantů. Metody pro jejich izolaci jsou však velmi zdoluhavé a pracné.

Moderní metody genových manipulací používají přenos genetické informace pro syntézu určitého enzymu na vhodný produkční mikroorganismus různými způsoby. K nim náleží např. přenos pomocí specifických vektorů, ať jsou to fágy, plazmidy nebo přímý přenos DNK. Vzniklé hybridní organismy nesou pak vlastnosti původního organismu spolu se získanými vlastnostmi novými ve vhodné kombinaci (např. regulační systém akceptora a strukturální gen donora). Získané vlastnosti těchto kmenů jsou však často poměrně málo stabilní a v průběhu dalších kultivací dochází k jejich ztrátám.

Velmi efektivní pro zvýšení produkce enzymů je amplifikace genů, řídících jejich syntézu. K amplifikaci může docházet různými způsoby. Jedním z nejjednodušších je pomnožení plazmidů nesoucích příslušný gen. Dalším způsobem jsou pak duplikace, popř. amplifikace genů na chromozomu. Ty vznikají buď normální rekombinací mezi identickými nebo téměř identickými sekvencemi lokalizovanými na vzdálených bodech chromozomu nebo zcela nezávisle na rekombinačním systému. Za podmínek výhodných pro duplikaci nebo amplifikaci tyto kmeny přerostou normální populací. Je to vlastně jeden z regulačních mechanismů, který má svou specifitu v přírodní selekci [3]. Na těchto principech je založena i naše selekční metoda.

Chemostatová selekční metoda pro získání vysokoproduktivních kmenů pro některé katabolické enzymy spočívá ve využití specifických selekčních tlaků. Selektce se provádí za limitace růstu kultury zdrojem uhlíku nebo dusíku, podle charakteru enzymu, jehož produkce má být zvýšena. Podmínky limitace induktorem a nízká zředovací rychlost jsou nevhodné pro induktivní syntézu enzymu, která je závislá na vnější koncentraci induktoru a naopak zvyšují konstitutivní syntézu enzymu, která nezávisí na koncentraci substrátu. Dochází k selekci konstitutivních mutantů, ty se v populaci nahromadí a přerůstají původní induktivní populaci. Při další kultivaci konstitutivních buněk za těchto podmínek se zvyšuje syntéza enzymu v důsledku amplifikace genů na chromozomu [4].

Tato metoda byla použita pro získání hyperproduktivních mutantů pro β -galaktosidasu a dále výrazně modifikována použitím jiných selekčních tlaků pro přípravu hyperproduktivních mutantů pro D-serin deaminasu a tryptofanasu [5, 7]. Touto cestou byly připraveny i hyperproduktivní mutanty pro dva i tři tyto enzymy produkováné současně [6, 8].

V této práci jsme se pokusili připravit kmen se zvýšenou produkcí amylo maltasy. Syntéza amylo maltasy u *E. coli* je řízena maltosovým regulonem, který se skládá ze tří operonů, jejich exprese je pod kontrolou pozitivního regulačného genu *malT*. Jednotlivé operony

jsou lokalizovány ve dvou genetických oblastech *malA* a *malB*. Oblast *malA* obsahuje operon *mal P, Q* (*P*-gen pro maltodextrin fosforylasu, *Q*-gen pro amylo maltasu) a regulační gen *malT*. Oblast *malB* obsahuje dva operony *malK*, *lamB* a *malE, F, G*, jejichž geny kódují proteiny mající vztah k transportu maltosy a maltodextrinu. Plná exprese tohoto regulonu vyžaduje působení komplexu *cAMP* — *CAP* [9, 10].

Tabulka 1. Srovnání aktivity amylo maltasy původního a získaného kmene

Kmen	Specifická aktivita amylo maltasy	
	M 53 + glycerol	M 56 + maltosa
ML 30	1,75	26,32
ML 30 A	8,2	49,7

Komplikovanost regulačního mechanismu spolu s lokalizací jednotlivých operonů ve dvou vzdálených oblastech chromozomu napovídají, že získání hyperproduktivního kmene pro amylo maltasu bude ve srovnání s ostatními uvedenými enzymy obtížnější. Kromě toho je známo, že k maximální syntéze amylo maltasy nedochází v logaritmické fázi růstu kultury, nýbrž až na přechodu do stacionární fáze [11], což vyžaduje i poněkud odlišné podmínky selekce v chemostatu.

MATERIÁL A METODY

Použitý mikroorganismus: *Escherichia coli* ML 30, induktivní pro amylo maltasu.

Médium: minerální médium M 56 [12] s maltosou jako jediným zdrojem uhlíku.

Použitá selekční metoda byla modifikací metody již dříve popsané [5].

Aktivita amylo maltasy byla měřena modifikovanou metodou *Fleminga a Perglera* [13], založenou na stanovení uvolněné glukosy glukosaoxidásou a dianisidinem. Aktivita enzymu byla vyjadřována jako specifická aktivita na mg suché hmotnosti buněk (nmoly uvolněné glukosy na mg suché hmotnosti buněk za 1 min při 37 °C).

VÝSLEDKY A DISKUSE

1. První selekce hyperproduktivního kmene pro amylo maltasu byla začata v chemostatu na minerální půdě M 56 s maltosou jako jediným zdrojem uhlíku v koncentraci $1,5 \times 10^{-3}$ M podobně jako při selekci hyperproduktivních mutantů pro β -galaktosidasu, kde byla použita laktosa ve stejné koncentraci. Vzhledem k tomu, že se amylo maltasa nesyntetizuje paralelně s růstem kultury jako β -galaktosidasu, byla na počátku kultivace použita vyšší zředovací rychlost $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$ oproti $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$, použité pro β -galaktosidasu. Cílem bylo získání vyšší hodnoty biomasy na počátku kultivace. Takto byl kultivován kmen *E. coli* ML 30 induktivní pro amylo maltasu prvních šest dnů. V tomto stadiu se hladina enzymu udržovala poměrně nízká. Po šesti dnech byl limit maltosy snížen na koncentraci 10^{-3} M a během 24 hodin se pětinašobně zvýšila syntéza amylo maltasy. Tato hladina enzymu se pak udržela dalších osm dnů kultivace za těchto podmínek, ale k dalšímu zvýšení syntézy enzymu již nedošlo. V tomto se liší selekce amylo maltasové mutanty od selekce hyperproduktivních mutantů pro β -galaktosidasu. Při limitu laktosy $1,5 \times 10^{-3}$ M a zředovací rychlosti $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ se po prvních 4 až 6 dnech selektovaly konstitutivní mutanty pro β -galaktosidasu, ty v kultuře přerostly původní induktivní kmen a po dalších 3 až 4 dnech začíná syntéza enzymu znovu stoupat až dosáhne deseti až patnáctinásobku původní induktivní hladiny. Po přenesení těchto mutantů do podmínek jednorázové kultivace na médium M 56 s glycerolem jako zdrojem uhlíku se zvýšená konstitutivní syntéza β -galaktosidasy udržuje i po několika pasážích. Naproti tomu kmen ML 30 A se zvýšenou produkcí amylo maltasy získaný selekcí v chemostatu po přenesení do podmínek jednorázové kultivace na médium M 56 s glycerolem vykazuje sice více než čtyřnásobné zvýšení ba-

zální hladiny enzymu ve srovnání s původním induktivním kmenem, ale hladina enzymu nedosahuje hodnoty zjištěné u původního plně indukovaného kmene. S maltosou jako zdrojem uhlíku se udržuje asi dvojnásobná hladina enzymu ve srovnání s plně indukovaným původním kmenem. Tento kmen ML 30 A nelze tedy považovat za konstitutivní v pravém slova smyslu.

2. V další selekci byl použit znovu původní kmen ML 30, avšak podmínky jako pro selekci hyperprodukčních mutant pro β -galaktosidasu (tj. koncentrace maltosy $1,5 \times 10^{-3}$ M a zředovací rychlost $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$ po celou dobu selekce). Za těchto podmínek probíhala selekce prakticky obdobně jako v prvním případě a dosáhlo se přibližně stejných hodnot hladiny amyloamaltasy.

Z výsledků vyplývá, že použité selekční podmínky neumožňují získání skutečně hyperprodukčních mutant pro amyloamaltasu. Přesto však získaný kmen ML 30 A syntetizuje dvojnásobné množství amyloamaltasy a bazální hladina enzymu se značně zvýší. Je otázka, zda bude možno dalšími změnami selekčních podmínek získat vyšší produkci enzymu, nebo zda regulační mechanismus řídící syntézu amyloamaltasy to nedovolí.

Lektoroval dr. V. Jirků, CSc.

Literatura

- [1] PARDEE A. B.: Fermentation Advances, Acad. Press, 1969, s. 253.
 - [2] DEMAIN A. L.: Methods in Enzymology **22**, 1971, s. 86.
 - [3] ANDERSON R. P., ROTH J. R.: Ann. Rev. Microbiol. **31**, 1977, s. 473.
 - [4] NOVICK A., HORIUCHI T.: Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **26**, 1961, s. 239.
 - [5] PAVLASOVÁ E., STEJSKALOVÁ E., SIKYTA B.: Biotechnol. Lett. **2**, 1980, s. 385.
 - [6] PAVLASOVÁ E., STEJSKALOVÁ E., SIKYTA B.: Biotechnol. Lett. **3**, 1981, s. 455.
 - [7] PAVLASOVÁ E., STEJSKALOVÁ E., SIKYTA B.: Biotechnol. Lett. **5**, 1983, s. 223.
 - [8] PAVLASOVÁ E., STEJSKALOVÁ E., SIKYTA B.: Biotechnol. Lett. **6**, 1984, s. 19.
 - [9] RAIBAUD O., SCHWARTZ M.: J. Bacteriol. **143**, 1980, s. 761.
 - [10] CHAPON CH.: J. Bacteriol. **150**, 1982, s. 722.
 - [11] PAVLASOVÁ E., STEJSKALOVÁ E., NEČINOVÁ S.: Curr. Modern Biol. **1**, 1967, s. 196.
 - [12] MONOD J., COHEN-BAZIRE D., COHN M.: Biochim. Biophys. Acta **7**, 1951, s. 585.
 - [13] FLEMING I. D., PERGLER H. F.: Analyst **88**, 1963, s. 967.
- Stejskalová, E. - Pavlasová, E. - Sikyta, B.: Kmen E. coli ML 30 se zvýšenou produkcí amyloamaltasy. Kvas. prům. 32, 1986, č. 7—8, s. 196—198.**
- Kmen se zvýšenou produkcí amyloamaltasy byl získán kultivací nízkoprodukčního kmene v chemostatu za specifických selekčních podmínek (změnami limitace růstu kultury maltosou).
- Стейскалова, Е., Павласова, Е., Сикита, Б.: Штамм E. coli ML 30 с повышенным производством амилоамальтазы. Квас. прум. 32, 1986, № 7—8, стр. 196—198.**
- Штамм с повышенным производством амилоамальтазы получен культивированием низкопроизводственного штамма в хемостате в специфических селективных условиях (изменениями лимитирования роста культуры с помощью мальтозы).
- Stejskalová, E. - Pavlasová, E. - Sikyta, B.: Strain E. coli ML 30 with Increased Production of Amylomaltase. Kvas. prům. 32, 1986, No. 7—8, pp. 196—198.**
- Strain with increased production of amyloamaltase was prepared from a low productive strain in the chemostat under specific selection conditions (by changing the limitation of culture growth by maltose).
- Stejskalová, E. - Pavlasová, E. - Sikyta, B.: Der E. coli ML 30 Stamm mit erhöhter Amylomaltase-produktion. Kvas. prům. 32, 1986, Nr. 7—8, S. 196—198.**
- Der Stamm mit erhöhter Amylomaltase-produktion wurde die Kultivierung eines schwach produzierenden Stammes im Chemostat unter spezifischen Selektionsbedingungen (durch Änderung in Limitierung des Wachstums der Kultur durch Maltose) gewonnen.