

Fermentační příprava lysinu s využitím mutant citlivých na aminokyseliny

665.12 663.15

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

Klíčová slova: *Corynebacterium*, mutanty citlivé na threonin a methionin, fermentační příprava lysinu

Vhodnými producenty lysinu mohou být nejen auxotrofní mutanty, ale i revertanty auxotrofních mutant. Revertanty mutant vyžadujících homoserin, rostoucí v syntetickém médiu a produkující lysin, byly inhibovány v růstu threoninem nebo methioninem. Inhibici lze potlačit přidáním methioninu nebo threoninu do média (Shio a Sano 1969). Mutanty citlivé na threonin (methionin) lze selektovat z buněčných suspenzí prototrofního kmene po aplikaci mutagenu a kultivaci v syntetických médiích s threoninem nebo methioninem (Sano a Shio, 1971). Citlivé mutanty indukované jednostupňovým mutačním zářím jsou mutanty bodové, zatímco u revertantů, získaných postupem dvoustupňovým, se může jednat o supresorové mutanty. Citlivé mutanty mají sníženou aktivitu dehydrogenasy homoserinu, což umožňuje přeměnu semialdehydu asparagové kyseliny za katalytického působení syntasy dihydrodipikolinové kyseliny na dihydrodipikolinovou kyselinu — první intermediát biosyntézy lysinu u bakterií.

Vycházejíce z prototrofního kmene *Corynebacterium glutamicum* 9366, izolovali jsme mutanty citlivé na threonin nebo methionin a zjišťujeme jejich schopnost hromadit v prostředí lysin, snažili jsme se jimi nahradit auxotrofní mutanty vyžadující homoserin, které se používaly jako produkční organismy při fermentační výrobě lysinu.

MATERIÁL A METODY

Mikroorganismus: Jako výchozí organismus při izolaci mutant sloužil prototrofní kmen *Corynebacterium glutamicum* 9366, hromadící v médiu kyselinu glutamovou (Musílková et al., 1966).

Média: Mutanty byly izolovány s použitím kompletního (KM) a minimálního média (MM) (Lederberg, 1950). Minimální médium bylo doplněno různými koncentracemi threoninu (methioninu) a threoninu + methioninu. Mutanty byly produkčně hodnoceny v syntetickém médiu C₁ a komplexním médiu SCH; jako inokulačního média bylo užito média CSL-B. Složení médií: médium C₁ (%): glukosa — 10, (NH₄)₂SO₄ — 4, KH₂PO₄ — 0,1, MgSO₄ · 7H₂O — 0,04, CaCO₃ — 5; FeSO₄ · 7H₂O — 5 mg · ml⁻¹, MnSO₄ · 4H₂O — 5 mg · ml⁻¹, Casitone (Difco) — 20 µg · ml⁻¹, biotin — 2 µg · ml⁻¹; pH — 7,0 až 7,2. Médium SCH (%): sacharosa — 18, kukuřičný výluh (65 % suš.) — 1, kyselý hydrolyzát arašídové mouky — 30 (% obj.), (NH₄)₂SO₄ — 1, KH₂PO₄ — 0,1, MgSO₄ · 7H₂O — 0,15, CaCO₃ — 3; pH — 7,5. Médium CSL-B (%): glukosa — 2, kukuřičný výluh (65 % suš.) — 1,5; pH — 7,0. Média byla sterilována při 120 °C 30 minut.

Chemikálie: K indukci mutant byl použit ethylmethansulfonát, Koch a Light, Velká Británie.

Izolace mutant: Buněčné suspenze kmene *C. glutamicum* 9366 byly vystaveny působení ethylmethansulfonátu (c = 0,05 mol · l⁻¹) po dobu 18 h a po promytí a zředění byly jimi očkované plotny s KM. Kolonie vyrostlé na plotnách byly přeneseny razídky na plotny s KM a plotny s MM doplněnými 500 µg · ml⁻¹ L-threoninu (L-methioninu) a 250 µg · ml⁻¹ a 500 µg · ml⁻¹ L-threoninu + L-methioninu.

Kultivace: Mutanty byly produkčně hodnoceny v 750 ml Erlenmeyerových baňkách se 60 ml média C₁ nebo SCH. Baňky byly očkované izolovanými mutanty a u vybraných mutantů 24hodinovým inokulem vyrostlým v médiu CSL-B a zaočkované baňky byly inkubovány 96 h při 28 °C na reciproce třepačce (frekvence — 1,5 Hz, délka kyvu — 90 mm). Při kultivaci v dvoulitrových fermentačních tancích, plněných 800 ml média, míchaných frekvencí 12,4 Hz a vzdušných 0,8 l · min⁻¹ vzduchu,

byly tanky očkovány 24hodinovým inokulem, vyrostlým v médiu CSL-B.

Analytické metody: Lysin byl stanoven manometrickou metodou (Gale, 1946).

VÝSLEDKY

Vystavením buněčné suspenze kmene *Corynebacterium glutamicum* 9366 dlouhodobému působení ethylmethansulfonátu a následnou selekcí na plotnách s minimálním médiem doplněným threoninem (methioninem) a threoninem + methioninem jsme izolovali postupem, který užili s kmenem *Brevibacterium flavum* Sano a Shio (1971), mutanty citlivé na threonin, methionin a threonin + methionin. O výsledcích izolace informuje tab. 1.

Tabulka 1. Izolace mutant kmene *Corynebacterium glutamicum* 9366 citlivých na threonin (methionin) a threonin + methionin

Počet testovaných kolonií	1 056
Počet izolovaných mutant	14
% izolovaných mutant	1,33
Počet Thr ^s -mutant	6
% Thr ^s -mutant	0,57
Počet Met ^s -mutant	8
% Met ^s -mutant	0,76
Počet (Thr+Met) ^s -mutant	0

Thr^s — citlivost na threonin, Met^s — citlivost na methionin

Z izolovaných mutant byly vybrány po produkčním hodnocení v baňkách, plněných médiem C₁, 4 mutanty hromadící lysin. Byly to 3 Thr^s-mutanty a 1 Met^s-mutant. Produkce kolísaly v rozmezí 9 až 11 g · l⁻¹ (96 h). Maximální produkce byla zaznamenána s mutantou *Corynebacterium glutamicum* 9366-T/6 (11,8 g · l⁻¹), která byla vybrána pro další práci.

Produkční schopnosti vybrané mutanty se sledovaly jednak v baňkách, plněných médiem C₁ a médiem SCH, jednak v dvoulitrových fermentačních tancích s médiem SCH. O výši produkce zaznamenané v baňkách a tancích v 96 h kultivace informuje obr. 1.

Maximální produkce lysinu byly zaznamenány při kultivaci v tancích (32 g · l⁻¹).

Produkci vybrané mutanty jsme se pokusili zvýšit postupem obdobným tomu, který byl použit u auxotrofní mutanty *Corynebacterium species* 9366-H-454 (Plachý et al. 1985), záležitím v doplnění produkčního média SCH kultivační tekutinou po fermentaci producenta homoserinu za současného snížení obsahu hydrolyzáta arašídové mouky v médiu SCH.

Po zjištění, že homoserin neinhibuje růst *Corynebacterium glutamicum* 9366-T/6, ověřovali jsme v měřítku 2 l fermentačních tanků, plněných médiem SCH, možnost nahradit částí hydrolyzáta arašídové mouky kultivační tekutinou mutanty *Corynebacterium species* 9366-EMS/329, jejíž obsah homoserinu kolísá v rozmezí 8 až 10 g · l⁻¹. Tabulka 2 informuje o produkčních dosahovaných mutantou *Corynebacterium glutamicum* 9366-T/6 v médiu SCH s 0, 6,6; 11; 16,5 a 20 % (obj.) hydrolyzáta arašídové mouky, doplněvaném 0, 12; 15; 20 a 25 % obj. kultivační tekutiny *Corynebacterium species* 9366-EMS/329 (tab. 2).

Zatímco v médiu bez hydrolyzáta bylo třeba k dosažení produkce 28 g · l⁻¹ lysinu doplnit médium 25 % kultivační tekutiny, bylo v médiu se 16,5 % hydrolyzáta a s polovičním množstvím tekutiny (12 %) zaznamenáno



Obr. 1. Srovnání produkce lysinu mutanty *Corynebacterium glutamicum* 9366-T/6 kultivované v médiích C₁ a SCH v baňkách a tancích

A — kultivace v médiu C₁ v baňkách, B — kultivace v médiu SCH v baňkách, C — kultivace v médiu SCH v dvoulitrových fermentačních tancích

Tabulka 2. Vliv různých koncentrací hydrolyzátu arašídové mouky a různého množství kultivační tekutiny po kultivaci producenta homoserinu na produkci lysinu mutantou *Corynebacterium glutamicum* 9366-T/6

KHAM (%)	V (%)	P (g.l ⁻¹)
0	25	28,3
6,6	12	24,0
	15	28,0
	20	37,8
	25	38,8
11,0	12	34,5
	15	36,0
	20	37,0
	25	40,5
16,5	12	49,0
20,0	12	48,0
	0	16,5

KHAM — koncentrace hydrolyzátu arašídové mouky
V — množství kultivační tekutiny po kultivaci mutanty *Corynebacterium* sp. 9366-EMS/329
P — produkce lysinu po 96 h kultivace

maximum produkce (49 g.l⁻¹). V médiu s 20 % hydrolyzátu, avšak nedoplňeném kultivační tekutinou obsahující homoserin, se dosáhlo produkci 16,5 g.l⁻¹ představující jen 50 % produkce zjištěné v nemodifikovaném médiu SCH s 30 % hydrolyzátu.

V médiu SCH doplněném vhodným množstvím hydrolyzátu arašídové mouky a kultivační tekutiny po fermentaci homoserinu se dosáhlo produkci 49 g.l⁻¹ srovnatelných s produkci 52 g.l⁻¹ zaznamenanými auxotrofní mutantou *Corynebacterium species* 9366-H-454 dependentní na homoserin (Plachý et al. 1985).

Thrs-mutanta *Corynebacterium glutamicum* 9366-T/6 představuje nejen rovnocennou náhradu homoserindependentní produkční mutanty *Corynebacterium species* 9366-H-454, ale i produkční kmen s větší genetickou stabilitou, u něhož nehrozí nebezpečí reverze v důsledku méně optimálních kultivačních podmínek.

DISKUSE

S použitím prototrofního kmene *Corynebacterium glutamicum* 9366 jako kmene výchozího jsme izolovali mutanty citlivé na threonin a methionin. Srovnáním našich

výsledků s výsledky, které uvádějí Sano a Shiio (1971), vyplynulo, že zatímco mutanty citlivé současně na threonin a methionin představují u japonských autorů nejpočetnější skupinu izolovaných mutant, nám se nepodařilo žádnou mutantu s touto genetickou charakteristikou izolovat — izolované mutanty byly citlivé buď na threonin, nebo methionin. Co se týče produkci lysinu, dosažených v syntetickém médiu, představovaly produkce námi izolovaných mutant (9 až 11 g.l⁻¹) průměr produkci, které uvádějí japonští pracovníci (5 až 15 g.l⁻¹).

K dosažení produkční úrovně srovnatelné s produkcemi auxotrofních mutant, především mutant dependentních na homoserin, zvolili Sano a Shiio (1971) postup, záležející v izolaci auxotrofních mutant odvozených od citlivých mutant. My jsme tohoto cíle dosáhli doplněním produkčního média se sníženým obsahem hydrolyzátu arašídové mouky kultivační tekutinou po fermentaci producenta homoserinu — postupem obdobným tomu, který byl použit v případě homoserindependentní auxotrofní mutanty (Plachý et al. 1985). Aplikaci mutanty citlivé na threonin a tohoto postupu se dosáhlo v měřítku 2 l fermentačních tanků produkci srovnatelných s produkcemi mutanty *Corynebacterium species* 9366-H-454 (Homoser-).

Literatura

- [1] GALE, E. F.: Adv. Enzymol. **6**, 1946, s. 1.
- [2] LEDERBERG, J.: Methods Med. Res. **3**, 1950, s. 5.
- [3] MUSÍLKOVÁ, M., NEČÁSEK, J., PLACHÝ, J., LOKVENC, F., ČERKES, L.: Folia Microbiol. **11**, 1966, s. 301.
- [4] PLACHÝ, J., ULBERT, S., PELECHOVÁ, J., KRUMPHANZL, V.: Folia Microbiol. **30**, 1985, s. 485.
- [5] SANO, K., SHIIO, I.: J. Gen. Appl. Microbiol. **17**, 1971, s. 97.
- [6] SHIIO, I., SANO, K.: J. Gen. Appl. Microbiol. **15**, 1969, s. 267.

Plachý, J. - Ulbert, S.: Fermentační příprava lysinu s využitím mutant citlivých na aminokyseliny. Kvas. prům. **33**, 1987, č. 7, s. 203—204.

Byla izolována mutanta *Corynebacterium glutamicum* 9366-T/6, citlivá na threonin, hromadící v médiu lysinu, která při kultivaci v produkčním médiu s 18 % sacharózy, 16,5 % kyselého hydrolyzátu arašídové mouky, doplněném ještě 12 % kultivační tekutiny po kultivaci producenta homoserinu, hromadila po 96 h kultivace v dvoulitrových fermentačních tancích 49 g.l⁻¹ lysinu.

Плахи. И. - Ульберт, С.: Ферментационное приготовление лизина при помощи мутантов чувствительных к аминокислотам. Квас. прум. **33**, 1987, № 7, стр. 203—204.

Byl vyделен mutant *Corynebacterium glutamicum* 9366-T/6, чувствительный к треонину, накапливающий в среде лизин, который при культивации в питательной среде с 18 % сахарозы, 16,5 % кислого гидролизата арахисовой муки, дополненной еще 12 % культуральной жидкости после ферментации штамма-продуцента гомосерина, накапливал в течении 96 часов культивации в ферментерах с емкостью 2 л 49 г.л⁻¹ лизина.

Plachý, J. - Ulbert, S.: Application of Mutants Sensitive to Amino Acids for a Preparation of Lysine by Fermentation. Kvas. prům. **33**, 1987, No. 7, pp. 203—204.

There has been isolated a mutant *Corynebacterium glutamicum* 9366-T/6, sensitive to threonine and producing lysine. The mutant was able to accumulate 49 g.l⁻¹ lysine in a medium containing 18 % sucrose, 16,5 % acid hydrolyzate of peanut meal and 12 % cultivation liquid after fermentation of homoserine producing bacterial mutant.

Plachý, J. - Ulbert, S.: Die fermentative Herstellung von Lysin mit Mutanten empfindlich gegenüber Aminosäuren. Kvas. prům. **33**, 1987, Nr. 7, S. 203—204.

Die Mutante *Corynebacterium glutamicum* 9366-T/6 wurde isoliert, welche gegenüber Threonin empfindlich ist und Lysin akkumuliert. Die Mutante hat in einem Medium mit 18 % Saccharose, 16,5 % — saures Arachismehlhydrolysat und 12 % Kulturmedium nach der Fermentation von Homoserin nach 4 Tagen Kultivation in 2 l Fermentor 49 g.l⁻¹ Lysin akkumuliert.