

Izolace mutant produkujících lysin v médiu s melasou

579 663

RNDr. JIŘÍ PLACHÝ, RNDr. FRANTIŠKA PALEČKOVÁ¹⁾, Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy**Klíčová slova:** *Brevibacterium flavum*, bacitracin, izolace mutant, fermentace, lysin, melasa, zdroj uhlíku

Při fermentační přípravě lysinu se jako zdroje uhlíku nejčastěji používají sacharidy glukosa nebo sacharosa, nahrazované při průmyslové výrobě melasou, představující nejen zdroj uhlíku, ale i růstových faktorů. Nicméně melasa obsahuje i některé složky inhibující růst produkčního organismu a výrazně snižující produkci lysinu. Při hledání vhodných produkčních organismů se osvědčily auxotrofně-regulační mutanty koryneformních bakterií, dependentní na homoserin nebo threonin, dále na threonin + methionin, leucin nebo isoleucin a rezistentní vůči analogům lysinu, threoninu nebo isoleucinu [švýc. pat., 1973], nebo mutanty vykazující rezistenci vůči antibiotikům — penicilinu, bacitracinu, cykloserinu, gramicidinu, polymyxinu, fungicidinu (USA pat., 1972).

Ve snaze izolovat vhodné producenty lysinu v médiích s melasou, izolovali jsme jednak vůči penicilinu a bacitracinu rezistentní mutanty, jednak mutanty vyrostlé v médiích s vysokým obsahem melasy a izolované mutanty druhu *Brevibacterium flavum* jsme produkčně hodnotili v médiích s melasou jako jediným zdrojem uhlíku.

MATERIÁL A METODY

Mikroorganismus: Mutantní kmen *Brevibacterium flavum* CB dependentní na homoserin (Hse⁻) a rezistentní vůči analogu lysinu, tj. vůči S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu (AEC^r) a jeho supresorová mutanta NMU-4 (Hse⁺, AEC^r).

Chemikálie: Penicilin G — draselná sůl (n. p. Biotika) a bacitracin (Lundbeck, Kodaň).

Medía: Při izolaci mutant bylo užito kompletní médium (KM- Lederberg, 1950) a médium USPS tohoto složení (%): glukosa — 4, pepton (Bacto) — 2, Beef extract (Difco) — 0,5, močovina — 0,5, KH₂PO₄ — 0,15, K₂HPO₄ — 0,05, MgSO₄ · 7 H₂O — 0,05, agar — 2, biotin — 50 µg · l⁻¹. Jako inokulační médium sloužilo médium USP stejného složení jako médium USPS, pouze s tím rozdílem, že neobsahovalo agar. Produkční médium ŠPM mělo složení (%): melasa — 15, hydrolyzát arašídové mouky — 2, močovina — 0,5, (NH₄)₂SO₄ — 0,5, KH₂PO₄ — 0,04, MgSO₄ · 7 H₂O — 0,05, CaCO₃ — 3. pH médií po sterilizaci bylo 7,0 až 7,2. Všechna média byla sterilována 30 min při 120 °C.

Mutagen: K indukci mutant bylo použito UV-záření, jehož zdrojem byla germicidní lampa Tesla (30 W); 5 ml promyté buněčné suspenze bylo exponováno 30 s v Petriho misce (Ø — 100 mm) tak, aby přežilo 0,5 až 1 % buněk.

Izolace mutant: Ozářenou buněčnou suspenzí byly očkovány (1% suspenze) 500 ml varné baňky s 20 ml médií USP a ŠPM, obsahujících 5 j. ml⁻¹ penicilinu nebo 20 µg · ml⁻¹ bacitracinu a zaočkované baňky byly inkubovány na rotační třepačce (frekvence otáček — 3,7 Hz, výstředník — 25 mm) 48–96 h při 28 °C. Vyrostlými kulturami byly očkovány baňky s médií téhož složení se zvýšeným obsahem antibiotika o 10 j. ml⁻¹ penicilinu nebo o 10 µg · ml⁻¹ bacitracinu. V médiích s penicilinem bylo provedeno 42, v médiích s bacitracinem 19 pasáží. Z každé pasáže byly očkovány Petriho misky s KM a médiem USPS, obsahujícím stejná množství antibiotika jako v baňkách, z nichž byly plotny očkovány. Izolované mutanty byly označeny jako Ab-mutanty.

1 % ozářené suspenze byly také očkovány baňky s médiem ŠPM, obsahujícím 50 % melasy a po 84 h submerzní kultivace byla kultura přeočkována do baněk s médiem ŠPM se zvýšeným obsahem melasy (60 %). Po 96 h submerzní kultivace byly výsevem na Petriho miskách s KM získány kolonie, které byly izolovány jako mutanty označené Me.

Kultivace: Produkční hodnocení izolovaných mutant v baňkách bylo prováděno zaočkováním 500 ml varných baněk

s 20 ml média ŠPM, a to 1 % 24 h inokula vyrostlého v médiu USP. Zaočkované baňky byly inkubovány na rotační třepačce a po 96 h kultivace byl odebrán vzorek na sá-novení lysinu.

Vybrané izolované mutanty byly také produkčně hodnoceny v 2 l a 20 l fermentačních tancích, plněných 800 ml a 10 l média ŠPM, očkovaných 1 % a 5 % 24 h inokula, vyrostlého v médiu USP v baňkách, míchaných frekvencí otáčení 12,8 a 6,8 Hz a vzdušných rychlostí 1 l · min⁻¹ a 5 l · min⁻¹. Po 72 h kultivace při 29 °C byl stanoven v kul-tivační tekutině obsah lysinu.

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

VÝSLEDKY A DISKUSE

Ab-mutanty *B. flavum* CB nebo *B. flavum* CB-NMU-4, indukované UV-zářením, byly selektovány v médiích obsahujících penicilin nebo bacitracin. Me-mutanty byly izolovány po aplikaci mutageny z médií s relativně vysokým obsahem melasy. Izolované mutanty byly produkčně hodnoceny v baňkách a dosahované produkce se srovnávaly s produkcí kontroly, kterou byl kmen *B. flavum* CB. O výši produkce izolovaných mutant informuje tab. 1.

Tabulka 1. Produkce lysinu dosahovaná produkčními mutanty v médiu s melasou jako zdrojem uhlíku při kultivaci v baňkách

Mutanta	Výchozí kmen ¹⁾	Charakteristika	Produkce v 96 h (g · l ⁻¹)
Ab-210	CB	45 j. ml ⁻¹ PNC	15,0
Ab-256	CB	70 µg · ml ⁻¹ BCT	27,4
Ab-292	NMU-4	180 j. ml ⁻¹ PNC	29,3
Ab-362	NMU-4	100 µg · ml ⁻¹ BCT	32,3
Ab-363	NMU-4	100 µg · ml ⁻¹ BCT	27,0
Ab-376	NMU-4	110 µg · ml ⁻¹ BCT	27,2
Ab-430	NMU-4	120 µg · ml ⁻¹ BCT	29,6
Ab-431	NMU-4	120 µg · ml ⁻¹ BCT	25,5
Ab-538	NMU-4	160 µg · ml ⁻¹ BCT	27,8
Ab-539	NMU-4	160 µg · ml ⁻¹ BCT	29,8
Ab-554	Ab-230	320 j. ml ⁻¹ PNC	24,5
Ab-650	Ab-157	270 µg · ml ⁻¹ BCT	14,2
Ab-653	Ab-230	320 j. ml ⁻¹ PNC	14,0
Me-5/50	CB	50 % MLS	23,0
Me-25/50	CB	50 % MLS	23,5
Me-34/50	CB	50 % MLS	25,0
Me-1/60	CB	60 % MLS	26,5
Me-3/60	Ab-554	60 % MLS	29,9
Me-5/60	CB	60 % MLS	23,0
Kontrola			12,5

BCT — bacitracin, MLS — melasa, PNC — penicilin

1) Výchozími organismy při izolaci mutant byly ve většině případů kmeny *B. flavum* CB a *B. flavum* CB-NMU/4 a jen ojediněle mutanty rezistentní k antibiotikům (mutanty Ab-157, Ab-230 a Ab-554).

Celkem bylo izolováno 13 Ab-mutant (4 mutanty rezistentní vůči penicilinu a 9 mutant rezistentních vůči bacitracinu), které převýšily svou produkcí kontrolní pokus. Stupeň rezistence vůči penicilinu kolísal v rozmezí 45 až 320 j. ml⁻¹, vůči bacitracinu v rozmezí 70–270 µg · ml⁻¹. Kromě Ab-mutant bylo izolováno 6 Me-mutant rostoucích a produkujících lysin v médiu s vysokou koncentrací melasy (50 a 60 %). Dosahované produkce lysinu v baňkách se pohybovaly v rozmezí 14–32 g · l⁻¹.

K produkčnímu hodnocení v 2 l tancích bylo vybráno 6 mutant, jednak s nižší (mutanty Ab-210, Ab-650, Ab-653), jednak s vyšší (mutanty Ab-256, Me-1/60, Me-3/60) produkcí lysinu v baňkách. Z obou souborů mutant (Ab-mutanty, Me-mutanty) byly vybrány mutanty s maximálními produkcemi zaznamenanými při kultivaci v 2 l tancích. Tyto mutanty byly podrobeny produkčnímu hodnocení v 20 l

1) Současná adresa: JZD Slušovice, Agrogen.

Tabulka 2. Produkce lysinu dosahovaná vybranými produkčními mutanty v médiu s melasou jako zdrojem uhlíku při kultivaci v 2 l a 20 l tancích

Mutanta	Charakteristika	Produkce v 72 h (g . l ⁻¹)	
		2 l FT	20 l FT
Ab-210	45 j . ml ⁻¹ PNC	29,0	
Ab-256	70 µg . ml ⁻¹ BCT	33,8	37,0
Ab-650	270 µg . ml ⁻¹ BCT	24,2	
Ab-653	320 j . ml ⁻¹ PNC	29,8	
Me-1/60	60 % MLS	22,1	
Me-3/60	60 % MLS	29,9	32,3

FT — fermentační tanky

fermentačních tancích. Výsledky produkčního hodnocení v tancích jsou uvedeny v tab. 2.

Rozmezí produkci při kultivaci v 2 l tancích bylo asi 22 až 34 g . l⁻¹. Ve srovnání s produkcemi dosaženými v baňkách bylo možno v případě mutant produkujících při kultivaci v baňkách relativně nízká množství lysinu zaznamenat výrazně zvýšení produkci při kultivaci v 2 l tancích. Maxima produkce v tomto měřítku dosáhla mutanta Ab-256 (33,8 g . l⁻¹).

Z mutant obou sledovaných linií (Ab-mutanty, Me-mutanty) dosahujících maximálních produkci při kultivaci v 2 l tancích (mutanty Ab-256 a Me-3/60) byla zaznamenána při kultivaci v 20 l tancích vyšší produkce u mutanty Ab-256 (37 g . l⁻¹ za 72 h).

Byla-li produkce mutanty Ab-256 (rezistentní vůči 70 µg . ml⁻¹ bacitracinu) srovnávána s produkcemi lysinu, kterých dosáhli v melasových médiích japonští pracovníci (US pat., 1972), kteří jako produkčních organismů použili mutanty rezistentní vůči penicilinu nebo polymyxinu, byla produkce vybrané mutanty, které jsme dosáhli v médiu s melasou jako jediným zdrojem uhlíku, nižší asi o 25 %. Byla však zároveň srovnatelná s produkcemi dostatečnými pro výrobu a dosahovanými auxotrofně-regulačními mutanty, rezistentními vůči analogům aminokyselin a současně dependentními na aminokyseliny (švýc. pat., 1973).

Literatura

- [1] GALE, E. F.: Adv. Enzymol. **6**, 1946, s. 1.
- [2] LEDERBERG, J.: Methods Med. Res. **3**, 1950, s. 5.
- [3] Švýc. pat. 535.831, 1973.
- [4] U.S. pat. 3,687.810, 1972.

Lektoroval dr. František Smékal, CSc.

Plachý, J. - Palečková, F.: Izolace mutant produkujících lysin v médiu s melasou. Kvas. prům. **33**, 1987, č. 12, s. 364—365.

Byla izolována mutanta druhu *Brevibacterium flavum* rezistentní vůči bacitracinu, která v médiu s melasou hromadila, po 72 h kultivace 37 g . l⁻¹ lysinu.

Плахи, И. - Палечкова, Ф.: Изоляция мутантов образующих лизин в среде с мелассой. Квас. прум. **33**, 1987, № 12, стр. 364—365.

Был получен мутант *Brevibacterium flavum* устойчивый к бацитрацину, который в питательной среде с мелассой в качестве источника углерода накапливал после 72 часов культивации 37 г . л⁻¹ лизина.

Plachý, J. - Palečková, F.: Isolation of Mutants Producing Lysine in a Medium with Molasses. Kvas. prům. **33**, 1987, No. 12, pp. 364—365.

A mutant of *Brevibacterium flavum* resistant to bacitracine, was isolated. The mutant accumulated 37 g . l⁻¹ lysine after 72 hours of cultivation in a medium containing molasses as a source of carbon.

Plachý, J. - Palečková, F.: Isolation von Mutanten produzierten Lysin in einem Medium mit Melasse. Kvas. prům. **33**, 1987, Nr. 12, S. 364—365.

Eine Mutante *Brevibacterium flavum*, resistent gegenüber Bacitracin, wurde isoliert. Die Mutante hat 37 g . l⁻¹ Lysine nach 72 h Kultivation in einem Medium mit Melasse als eine Kohlenstoffquelle akkumuliert.