

# Vliv frakcí melasy na růst a produkci lysinu u mutantu druhu *Brevibacterium flavum*

663.18 579

RNDr. JIŘÍ PLACHÝ, Ing. JIŘÍ PELZBAUER, PhMr. VLADIMÍR BULANT, RNDr. FRANTIŠKA PALEČKOVÁ, Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

**Klíčová slova:** mikroorganismus, *Brevibacterium flavum*, lysin, inhibice, uhlík, zdroj, melasa, aminokyseliny, sacharosa, mutanta

Při ověřování možností využití melasy jako zdroje uhlíku při fermentační přípravě lysinu byly izolovány mutanty koryneformních bakterií rezistentní vůči antibiotikům nebo vyrostlé v médiích s vysokým obsahem melasy (Plachý a Palečková, 1987), které se osvědčily jako vhodné producenti. Bylo však zjištěno, že melasa ve vyšších koncentracích snižuje výrazně nejen produkci lysinu, ale inhibuje i růst produkčního organismu. Ve své práci se zabýváme zjištěním, která z frakcí melasy působí inhibičně na růst a produkci lysinu a náhradou sacharosy v médiu frakcí melasy obsahující téměř veškerý cukr melasy.

## MATERIÁL A METODY

**Mikroorganismus:** Mutanta *Brevibacterium flavum* CB rezistentní vůči analogu lysinu, tj. vůči S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu (AEC) a dependentní na homoserin (Homoser-) — (Bučko et al. 1983) a mutantu *Brevibacterium flavum* CB-Me/3-60, rezistentní vůči AEC, dependentní na homoserin a rostoucí v médiu s relativně vysokým obsahem melasy (Plachý a Palečková, 1987).

**Media:** Při sledování nárůstu bylo použito médium kompletní a minimální (KM a MM — Lederberg, 1950). MM bylo doplněno biotinem, homoserinem a thiaminem, a to 2, 100 a 10  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  těchto látek. K zjištění výše produkce byla užitá média CSL-B-S (inokulační) a médium B (produkční). Složení média CSL-B-S (%): sacharosa — 2, kukuřičný výluh — 1,5; pH — 7,0. Složení média B (viz Plachý a Ulbert, 1985). Všechna média byla sterilována při tlaku 0,12 MPa 30 min.

**Příprava frakcí melasy a jejich charakteristika:** Frakce melasy označené 1–3 byly připraveny filtrací roztoku melasy s aktivním uhlím a následným dělením na sloupce katexu Ostion KS (v Na<sup>+</sup>-cyklu). Frakce I–IV byly získány dělením zředěné melasy na baterii sloupců tvořené ionexy Ostion KS (v H<sup>+</sup>-cyklu) a Amberlit IRA 45 (v OH<sup>-</sup>-cyklu) a neionogenní makroporézní styren-divinylbenzenovou pryskyřici dodanou z Výzkumného ústavu syntetických pryskyřic a laků v Pardubicích. Zahuštěný filtrát za posledním sloupcem představoval cukernou frakci I, eluát katexu frakci II, eluát anexu frakci III a eluát neionogenní pryskyřice frakci IV. Charakteristika jednotlivých frakcí je uvedena v tab. 1.

**Kultivace:** Plotny byly po naočkování vhodně zředěnými buněčnými suspenzemi inkubovány v termostatu 2 až 3 dny při 28 °C. K ověření výše produkce lysinu byly použity varné 500 ml baňky, plněné 20 ml produkčního média B a zaočkované 10 % (obj.) 24hodinového inokula vyrostlého v médiu CSL-B-S, které byly inkubovány na rotační třepačce (frekvence otáček — 3,7 s<sup>-1</sup>, výstředník — 25 mm) 4 dny při 28 °C.

Tabulka 1. Charakteristika frakcí melasy

Frakce	Sušina (%)	Sacharidy (%)	Složky melasy
1	78	50	Barviva, anorganické soli betain
2	77	75	Soli a dusíkaté látky
3	74	58	Většina aminokyselin
I	79	70	Sacharidy
II	43	0,3	Kationty, aminokyseliny
III	56	0,3	Anionty, amonné soli organických kyselin
IV	2,3	0,1	Neionogenní lipofilní látky

Obsah sušiny a sacharidů ve vzorku melasy před dělením činil 78 % a 57 %.  
K přípravě jednotlivých frakcí melasy bylo použito řepné melasy.

**Analytické metody:** Lysin byl stanovován manometrickou metodou (Gale, 1946). Obsah aminokyselin ve frakci 3 byl stanoven na automatickém analyzátoru aminokyselin T 339 (Mikrotechna, Praha).

## VÝSLEDKY A DISKUSE

Při ověřování vlivu náhrady sacharidů v médiu melasou byla glukosa v MM a sacharosa v médiu B nahrazeny melasou (média MM-M a B-M). Na plotnách s MM, očkovaných zředěnou buněčnou suspenzí, získanou 24hodinovou submerzní kultivací v KM a v baňkách s médiem B, zaočkovaným inokulem, byl zjišťován jednak počet buněk v ml, jednak výše produkce lysinu (tab. 2).

Tabulka 2. Vliv náhrady sacharidů melasou na růst a produkci lysinu u *Brevibacterium flavum* CB

Médium	Počet buněk v ml	Produkce (g · l <sup>-1</sup> )
MM	$1,19 \times 10^{16}$	—
MM-M	$2,40 \times 10^{10}$	—
B	—	27,75
B-M	—	15,50

Náhrada sacharidů melasou se projevila jak snížením počtu buněk v ml, tak poklesem produkce.

Zjišťující, která z frakcí melasy způsobuje inhibici růstu a produkce, stanovili jsme výši produkce a počet buněk v ml v médiích B a MM, ve kterých sacharosa a glukosa byly nahrazeny frakcemi melasy 1–3 a I–III. Jako kontrol bylo užitó médií MM-M a B-M (tab. 3 a 4).

Tabulka 3. Vliv frakcí melasy 1–3 a I–III na růst *Brevibacterium flavum* CB

Médium	Počet buněk v ml
MM	$3,42 \times 10^{18}$
MM-M-1	$1,20 \times 10^{17}$
MM-M-2	$1,39 \times 10^{14}$
MM-M-3	$1,00 \times 10^{11}$
MM-M-I	$9,78 \times 10^{17}$
MM-M-II	$1,18 \times 10^{17}$
MM-M-III	$9,47 \times 10^{14}$
MM-M	$1,77 \times 10^{11}$

MM-M-1 až 3 — minimální médium s frakcemi 1 až 3 jako zdroji uhlíku.  
MM-M-I až III — minimální médium s frakcemi I až III jako zdroji uhlíku.

Tabulka 4. Vliv frakcí melasy 1–3 a I–III na produkci lysinu u *Brevibacterium flavum* CB

Médium	Produkce (g · l <sup>-1</sup> )
B	28,75
B-M-1	27,46
B-M-2	26,20
B-M-3	9,68
B-M-I	26,40
B-M-II	13,35
B-M-III	21,50
B-M	12,87

B-M-1 až 3 — médium B s frakcemi 1 až 3 jako zdroji uhlíku.  
B-M-I až III — médium B s frakcemi I až III jako zdroji uhlíku.



Z testovaných frakcí melasy vykazovala maximální inhibiční účinek jak na růst, tak na produkci lysinu frakce 3 obsahující většinu aminokyselin. Inhibiční účinek této frakce lze přičítat — spíše než toxickému účinku projevujícím se inhibicí růstu — regulačnímu mechanismu, a to pravděpodobně mechanismu zpětné vazby („feedback regulation“), výrazně se uplatňujícím při biosyntéze aminokyselin.

S cílem srovnat produkci v médiu doplněném frakcí I obsahující téměř veškeré sacharidy melasy s produkcí v kontrolním médiu se sacharosou (médiu B), byl sledován vliv různých koncentrací sacharidické frakce přítomné v médiu B (médiu B-M-F) na výši produkce lysinu dosažované mutanty *Brevibacterium flavum* CB a *Brevibacterium flavum* CB-Me/3-60 (tab. 5).

Tabulka 5. Vliv různých koncentrací sacharidické frakce na produkci lysinu u *Brevibacterium flavum* CB a *Brevibacterium flavum* CB-Me/3-60

Mutanta	Méduum	Koncentrace frakce (%)	Produkce (g · l <sup>-1</sup> )
<i>B. flavum</i> CB	B	—	28,88
	B-M	—	13,44
	B-M-F	8,5	16,81
		17	17,42
		26	21,55
		34	20,35
<i>B. flavum</i> CB-Me/3-60	B	—	28,54
	B-M	—	15,52
	B-M-F	8,5	19,13
		17	25,06
		26	25,89
		34	24,27

Se zvyšující se koncentrací sacharidické frakce v médiu B-M-F rostla produkce lysinu, dosahující maxima v médiu B-M-F s 26 % sacharidické frakce. Relativně vyšší produkce byly zaznamenány v médiu B-M-F zaočkovaném mutantou *Brevibacterium flavum* CB-Me/3-60. Po srovnání dosažených produkcí s produkcí zaznamenanou v médiu B je možno konstatovat, že maximální produkce v médiu B-M-F představují 75 % (u mutanty *B. flavum* CB) až 90 % (v případě mutanty *B. flavum* CB-Me/3-60) produkce v médiu B, tj. v médiu se sacharosou.

Při náhradě sacharidů v produkčním médiu melasou lze dosáhnout produkci lysinu téměř shodných s produkcemi v sacharosovém médiu při užití mutant rostoucích v médiích s relativně vysokým obsahem melasy a při aplikaci sacharidické frakce melasy jako zdroje uhlíku.

#### Literatura

- [1] BUČKO, M., HANO, A., RAVALLOVÁ, V., MIKLÁŠ, E., HOFBAUER, H., SIKYTA, B., PLACHÝ, J., ULBERT, S., ČULIK, K., VANICKÝ, M., CHROMK, J., SEVERA, Z.: Čs. patent 199 775, 1983.
- [2] GALE, E. F.: Adv. Enzymol., **6**, 1946, s. 1.
- [3] LEDERBERG, J.: Methods Med. Res., **3**, 1950, s. 5.

[4] PLACHÝ, J., ULBERT, S.: Kvas. prům., **31**, 1985, s. 159.

[5] PLACHÝ, J., PALEČKOVÁ, F.: Kvas. prům., **33**, 1987, s. 364.

Lektoroval dr. František Smékal, CSc.

**Plachý, J. - Pelzbauer, J. - Bulant, V. - Palečková, F.: Vliv frakcí melasy na růst a produkci lysinu u mutant druhu *Brevibacterium flavum*.** Kvas. prům. **34**, 1988, č. 3, s. 70—71.

Při aplikaci melasy jako zdroje uhlíku dochází k inhibici růstu a ke snížení produkce lysinu u mutant *Brevibacterium flavum* CB. Frakce melasy obsahující většinu aminokyselin vykazovala maximální inhibiční účinek na růst a produkci. Byla-li jako zdroj uhlíku použita místo melasy její cukerná frakce, dosáhlo se produkcí představujících 75 až 90 % produkce v médiu se sacharosou.

Плахи, И. — Пелцбауер, И. — Булант, В. — Палечкова, Ф.: Влияние фракций мелассы на рост и продукцию лизина у мутантов вида *Brevibacterium flavum*. Квас. прум., **34**, 1988, № 3, стр. 70—71.

Při применении мелассы в качестве источника углерода возможно наблюдать ингибирование роста и понижение продукции лизина у мутанта *Brevibacterium flavum* CB. Фракция мелассы содержащая большинство аминокислот оказывала максимальный ингибирующий эффект на рост и продукцию. Если в качестве источника углерода использовали не меласу но ее фракцию содержащую почти весь сахар, то достигли продукции представляющих 75—90 % продукции в среде со сахарозой.

**Plachý, J. - Pelzbauer, J. - Bulant, V. - Palečková, F.: An Influence of Molasses Fractions on Growth and Lysine Production of Mutants of Species *Brevibacterium flavum*.** Kvas. prům. **34**, 1988, No. 3, pp. 70—71.

After a substitution of sugar by molasses there were appeared a growth inhibition and a decrease of lysine production of a mutant *Brevibacterium flavum* CB. A fraction of molasses containing most of amino acids had a maximal inhibitory effect as to both the growth and the production. When a sugar fraction of molasses was used as a carbon source the productions were achieved which represented 75—90 % of the production reached in a medium containing sucrose.

**Plachý, J. - Pelzbauer, J. - Bulant, V. - Palečková, F.: Beeinflussung der Melassefraktionen auf das Wachstum und die Lysin-Produktion bei Mutanten der Art *Brevibacterium flavum*.** Kvas. prům. **34**, 1988, Nr. 3, S. 70—71.

Hemmung des Wachstums und Erniedrigung der Lysinproduktion bei der Mutante *Brevibacterium flavum* CB kann man beobachten, wenn Melasse wie eine Kohlenstoffquelle angewendet wird. Eine Aminosäuren enthaltende Fraktion hat eine maximale hemmende Wirkung auf das Wachstum und die Produktion. Nach Anwendung einer Zuckerfraktion von Melasse an Stelle von Melasse haben die Lysinproduktionen 75—90 % der Produktion repräsentiert, welche in dem Nährmedium mit Saccharose erreicht hatte.