

# Využití mutanty *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100 při fermentační přípravě lysinu

RNDr. Jiří PLACHÝ a Ing. Stanislav ULBERT

Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

**Klíčová slova:** *Izolace auxotrofně-regulačních mutant, mutanta Corynebacterium glutamicum 9366-AEC/100, rezistence vůči analogu lysinu a dependence na homoserin, vývoj technologie fermentační přípravy lysinu*

*Sano a Shiio* [1] zjistili relativně vysokou produkci lysinu u mutant *Brevibacterium flavum* rezistentních vůči analogu lysinu, tj. vůči S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu (AEC). Nadprodukcí lysinu nebrání u AEC<sup>r</sup>-mutant s desenzibilizovanou aspartatkinasou (EC 2.7.2.4, ATP:L-aspartat 4-fosfortransferasa) kooperativní inhibice lysinem a threoninem. Je-li současně zabráněno metabolické přeměně 4-asparagaldehydové kyseliny na threonin, a to indukci dependence na homoserin (Hse<sup>-</sup>), je 4-asparagaldehydová kyselina přednostně využívána při biosyntéze lysinu.

Cílem práce byla izolace AEC<sup>r</sup>, Hse<sup>-</sup>-mutant *Corynebacterium glutamicum* 9366 a vypracování fermentační technologie lysinu za použití vhodné AEC<sup>r</sup>, Hse<sup>-</sup>-mutanty.

## MATERIÁL A METODY

**Mikroorganismus:** Kmen *Corynebacterium species* 9366 [2], identifikovaný jako kmen *Corynebacterium glutamicum* 9366, byl vybrán jako kmen vhodný pro izolaci mutant.

**Chemikálie:** K indukci mutant byl použit ethylmethansulfonát (EMS) fy Koch and Light.

**Média:** Média KM a MM (izolace mutant), CSL-B a B (produkčního hodnocení v baňkách) a CSL-B-S a B-F (fermentace v tancích), používaná již dříve [3]; byla aplikována i v této práci (médium B-F obsahovalo jako zdroj uhlíku sacharosu).

**Izolace mutant:** Mutanty byly indukovány dlouhodobým působením EMS (50 mmol.l<sup>-1</sup>, 18 h) a selektovány na plotnách doplněných AEC a homoserinem.

**Kultivace:** Izolované mutanty byly produkčně hodnoceny v 500 ml varných baňkách plněných 20 ml média B a očkovaných 24 h inokulem vyrostlým v médiu CSL-B. Kultivace v tancích byly prováděny za použití média CSL-B-S (inokulační) a B-F (produkční). pH během kultivace bylo upravováno na hodnotu 7,0 vodným roztokem amoniaku.

**Analytické metody:** Růst byl zjišťován gravimetrickým stanovením sušiny, lysin byl stanovován manometricky [4], při sledování spotřeby sacharosy byl využit analyzátor glukosy Glucose Analyzer 2 (Beckman, USA), pro stanovení rozpuštěného kyslíku byl aplikován přístroj Oxygen Dissolved (Beckman, USA). pH bylo měřeno pH-metrem OP-208 (Radelkis, MLR).



## VÝSLEDKY A DISKUSE

Byly izolovány AEC<sup>r</sup>, Hse<sup>-</sup>-mutanty *C. glutamicum* 9366, které po ověření stupně rezistence byly produkčně hodnoceny v baňkách inkubovaných 4 dny na rotační třepačce (frekvence otáček — 3,7 s<sup>-1</sup>, výstřednost — 25 mm) při 28 °C. Výsledky izolace a produkčního hodnocení jsou uvedeny v tab. 1.

Z 2 909 testovaných kolonií bylo izolováno 110 mutant, tj. 3,8 %. Polovina z izolovaných mutant (51 %) byla rezistentní vůči 1 mg.ml<sup>-1</sup> AEC; 20 mutant (18,2 %) produkovalo lysin. Nejčastěji (75 %) byly zastoupeny mutanty produkující 1 až 10 g.l<sup>-1</sup> lysinu. Jen 2 mutanty (10 %) produkovaly 20 až 30 g.l<sup>-1</sup>. Z nich byla vybrána mutanta *C. glutamicum* 9366-AEC/100, rezistentní vůči 5 mg.ml<sup>-1</sup> AEC, která produkovala 23 g.l<sup>-1</sup> lysinu (po 4 dnech kultivace). Tato produkce je srovnatelná s produkcemi, které uvádějí Sano a Shiō [1] pro AEC<sup>r</sup>-mutanty *B. flavam*.

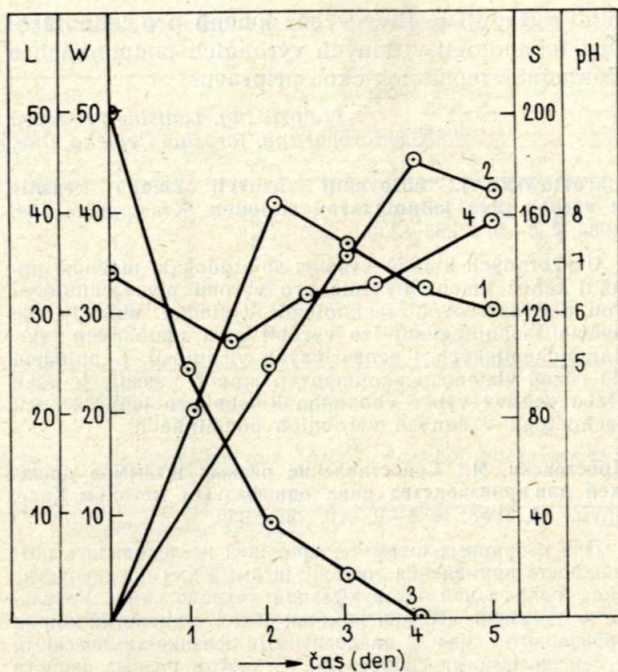
Tabulka 1. Izolace lysin produkujících mutant *Corynebacterium glutamicum* 9366 rezistentních vůči analogu lysinu a dependentních na homoserin

Počet testovaných kolonií	2 909
Počet izolovaných mutant	110
Podíl izolovaných mutant (%)	3,8
Počet mutant rezistentních vůči koncentraci AEC:	
1 mg. ml <sup>-1</sup>	56
5 mg. ml <sup>-1</sup>	43
10 mg. ml <sup>-1</sup>	11
Počet mutant produkujících lysin	20
Podíl mutant produkujících lysin (%)	18,2
Počet mutant produkujících lysin v množství:	
1–10 g. l <sup>-1</sup>	15
11–20 g. l <sup>-1</sup>	3
21–30 g. l <sup>-1</sup>	2

Vybraná mutanta *C. glutamicum* 9366-AEC/100 byla kultivována (po ověření stimulačního účinku biotinu na produkci v orientačních pokusech), v 20 l tanku, plněném 10 l média B-F, doplněného biotinem a očkovaném 5 % (obj.) 24 h inokula vyrostlého v baňkách s médiem CSL-B-S; tanky byly míchány frekvencí otáček 6,8 s<sup>-1</sup> a vzdušněny 5 l.min<sup>-1</sup> vzduchu. Fermentace lysinu u *C. glutamicum* 9366-AEC/100 v 20 l tanku je znázorněna v grafu 1.

V médiu B-F s 20 % sacharosy a 4 % kukuřičného výluhu, doplněném 200 µg.l<sup>-1</sup> biotinu, bylo dosaženo po 4 dnech kultivace produkce 45 g.l<sup>-1</sup>. Také Sano a Shiō [1] zjistili, že produkci lysinu stimuluje zvýšení koncentrace růstových faktorů v produkčním médiu (zdrojem růstových faktorů japonských autorů byl bílkovinný hydrolyzát Miei).

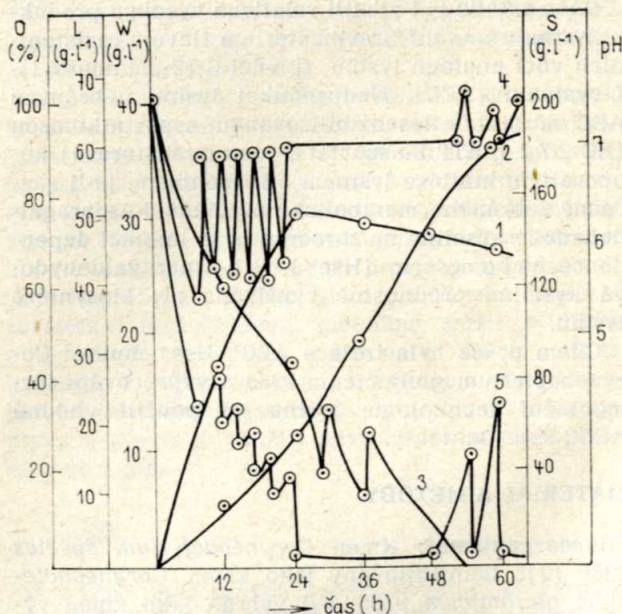
Výsledky dosažené v 20 l tanku byly ověřovány v 300 l poloprovozním tanku, plněném 150 l média B-F (s 200 µg.l<sup>-1</sup> biotinu), míchaném frekvencí otáček 6 s<sup>-1</sup> a vzdušněným 100 l.min<sup>-1</sup> vzduchu. Optimální podmínky vzdušnění byly navozeny periodickou úpravou pH během fermentace, záležející ve využití poklesu pH kultivační tekutiny pod hodnotu 5,8 v důsledku metabolické aktivity produkč-



Obr. 1. Fermentace lysinu u *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100 v 20 l tanku

křivka 1 — sušina = W (g.l<sup>-1</sup>), 2 — lysin = L (g.l<sup>-1</sup>), 3 — sacharid = S (g.l<sup>-1</sup>), 4 — pH

ního organismu, provázeném snížením spotřeby kyslíku a zvýšením koncentrace rozpuštěného kyslíku a následné úpravy pH na hodnotu 7,0 až 7,2, vedoucí k obnově metabolické aktivity buněk. V sérii pokusů bylo zjištěno, že udržením vyšší koncentrace rozpuštěného kyslíku v kultivační tekutině během růstové fáze a limitní koncentrace v produkční fázi lze dosáhnout maximálních produkci lysinu, tj. až 60 g.l<sup>-1</sup> za 60 h kultivace (graf 2).



Obr. 2. Fermentace lysinu u *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100 v 300 l tanku

křivka 1 — sušina = W, 2 — lysin = L, 3 — sacharid = S, 4 — pH, 5 — nasycení kyslíkem = O



Vypracovaný postup fermentační přípravy lysinu, ověřený v provozním měřítku (tank 50 m<sup>3</sup>), byl využit při vývoji fermentační technologie, kterou bylo možno získat po izolaci z kultivační tekutiny technický i krystalický lysin s 35 a 95 % účinné látky. Při izolaci technického preparátu byl lysin z kultivační tekutiny izolován adsorpcí na silně kyselý katex Ostion KS a zahuštěný eluát byl usušen v rozprašovací sušárně. Ze zahuštěného eluátu byl krystalický lysin získán následnou krystalizací.

#### Literatura

- [1] SANO, K. - SHIIO, I.: J. Gen. Appl. Microbiol., **16**, 1970, s. 373
- [2] MUSÍLKOVÁ, M. - NEČÁSEK, J. - PLACHÝ, J. - LOKVENC, F. - ČERKES, L.: Folia Microbiol., **11**, 1966, s. 301
- [3] PLACHÝ, J. - ULBERT, S.: Kvas. prům., **31**, 1985, s. 161
- [4] GALE, E. F.: V Advances in Enzymology (F. F. Nord, ed.), vol. 24, Interscience Publishers, Inc., New York, 1946, s. 1.

Lektoroval dr. František Smékal, CSc.

**Plachý, J. - Ulbert, S.: Využití mutanty *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100 při fermentační přípravě lysinu.** Kvas. prům., **34**, 1988, č. 8—9, s. 239—241.

Byla izolována mutanta *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100 rezistentní vůči analogu lysinu a dependentní na homoserin, umožňující dosáhnout po 60 hodinách kultivace produkce 60 g.l<sup>-1</sup> lysinu při konverzi 28 % a získat technický nebo krystalický lysin s 35 a 95 % účinné látky.

**Плахи, И. — Ульберт, С.: Использование мутанта *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100 для приготовления лизина ферментативным путем.** Квас. прум., **34**, 1988, № 8—9, стр. 239—241.

Был выделен мутант *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100, устойчив против аналога лизина и нуждающийся в гомосерине, с которым было возможно достичь после 60 часов культивации продукции 60 г.л<sup>-1</sup> лизина при конверсии 28 % и получить технический или кристаллический лизин, содержащий 35 или 95 % активного вещества.

**Plachý, J. - Ulbert, S.: Using a Mutant *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100 for a Preparation of Lysine by Fermentation.** Kvas. prům., **34**, 1988, No. 8—9, pp. 239—241.

A mutant of *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100, resistant to a lysine analogue and dependent to homoserine, has been isolated. The mutant is capable to produce 60 g.l<sup>-1</sup> lysine after 60 h of cultivation at a converse rate 28 %. There is possible to obtain both technical and crystalline lysine with purity 35, resp. 95 %.

**Plachý, J. - Ulbert, S.: Verwertung der Mutante *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100 für eine mikrobielle Herstellung von Lysin.** Kvas. prům., **34**, 1988, Nr. 8—9, S. 239—241.

Eine Mutante *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100, welche resistent gegenüber einem Analog von Lysin ist und welche Homoserin für das Wachstum benötigt, wurde isoliert. Mit dieser Mutante wurde eine Produktion von 60 g.l<sup>-1</sup> nach 60 Stunden der Kultivierung (bei Konversion 28 %) erreicht und man kann technischer oder krystallinischer Lysin mit 35 und 95 % Inhalt von Lysin erhalten.