

Využití auxotrofně-regulačních mutant *Corynebacterium glutamicum* při fermentační přípravě lysinu

RNDr. JIŘÍ PLACHÝ, Ing. STANISLAV ULBERT a RNDr. FRANTIŠEK SMĚKAL
Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

Klíčová slova: Izolace auxotrofně-regulačních mutant, mutanta *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100/Leu-6, rezistence vůči analogu lysinu, dependence na homoserin a leucin, produkce lysinu v médiích s ethanolem nebo octovou kyselinou

Při fermentační výrobě lysinu se osvědčily jako vhodné produkční organismy mutanty auxotrofně-regulační, vykazující kromě rezistence vůči analogu lysinu ještě dependenci na aminokyseliny nebo složky nukleových kyselin. Tak byly zaznamenány vysoké produkce lysinu při kultivaci mutant *Brevibacterium lactofermentum* rezistentních vůči S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu (= analog lysinu) a dependentních na alanin nebo leucin [1, 2]. Tyto vysoké produkce byly dosaženy v médiích se sacharidy jako zdroji uhlíku. Avšak jako zdroje uhlíku se uplatnily při fermentační přípravě aminokyselin kromě sacharidů také produkty petrochemického průmyslu, např. ethanol a octová kyselina [3].

Cílem práce byla izolace auxotrofně-regulačních mutant druhu *Corynebacterium glutamicum* produkujících lysin a ověření možnosti fermentační přípravy lysinu s vybranou mutantou v médiích s ethanolem nebo octovou kyselinou jako zdroji uhlíku.

MATERIÁL A METODY

Mikroorganismus: Mutantní kmen *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100 rezistentní vůči S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu (AEC^r) a dependentní na homoserin (Hse⁻).

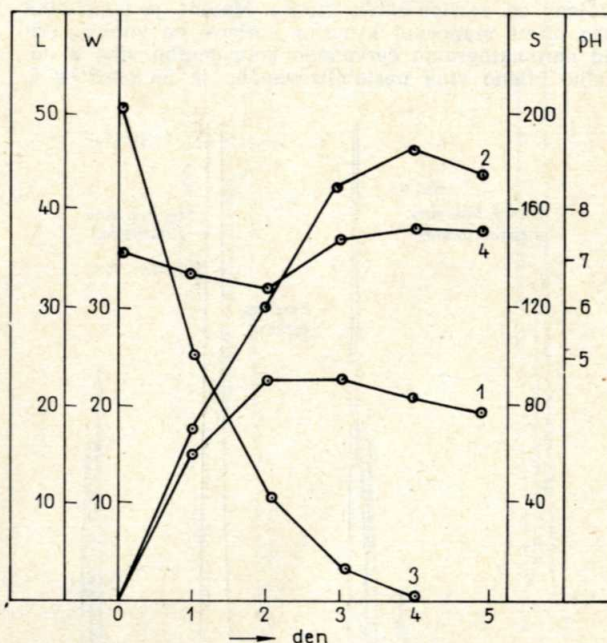
Chemikálie: K indukci mutant byl použit ethylmethan-sulfonat (EMS) fy Koch and Light (V. Británie). Jako zdroje uhlíku byla použita technická sacharosa, octová kyselina (pro analýzu) a velejenný, kvasný ethanol 96,61 % hmot. (hustoty 806,4 kg/m³ při 20 °C) o složení (mg/kg) celkové kyseliny — 6, acetaldehyd — 6, aceton — 1, ethylmethyleketon — 2, ethylacetát — 11, se sto-povými množstvími methanolu.

Média: Média KM a MM (izolace mutant), CSL-B a B (produkční hodnocení v baňkách) a média CSL-B-S a B-F se sacharosou jako zdrojem uhlíku (fermentace v tancích) byla užita již dříve [4]. Složení inokulačních a produkčních médií s ethanolem (média CSL-B-E a B-F-E) a octovou kyselinou a octany (média CSL-B-A a B-F-A) bylo následující (g/100 ml): médium CSL-B-E: octan sodný — 1,5, sacharosa — 2, kukuřičný výluh („corn-steep liquor“, CSL — 65 % sušiny) — 3; médium B-F-E: sacharosa — 1, ethanol — 0,5, CSL — 1, kyselý hydrolyzát arašídové mouky (HAM) — 15 (% obj.), (NH₄)₂SO₄ — 1, KH₂PO₄ — 0,1, MgSO₄·7H₂O — 0,01, CaCO₃ — 3, biotin — 50 µg/l; médium CSL-B-A: octan sodný — 5, sacharosa — 4, CSL — 3; médium B-F-A: octan sodný — 4, HAM — 15, CSL — 1, (NH₄)₂SO₄ — 1, KH₂PO₄ — 0,1, MgSO₄·7H₂O — 0,01, CaCO₃ — 3, biotin — 50 µg/l; pH médií po sterilizaci (při 120 °C, 30 min) bylo 7,0–7,2.

Izolace mutant: Mutanty byly indukovány dlouhodobým působením EMS (50 mmol/l, 18 h) a selektovány na plotnách s MM doplněným AEC, homoserinem a leucinem, resp. adeninem, alaninem, serinem.

Kultivace: Při kultivaci v baňkách a tancích byl použit postup popsán již dříve [4]. Kultivace v médiích obsahujících ethanol nebo octovou kyselinu byly prováděny jednak v 2-l, jednak v 20-l tancích. 20-l tanky byly vybaveny buď automatickým analyzátozem ethanolu „Metrex“, umožňujícím udržení konstantní koncentrace ethanolu [5] nebo pH-statem (BioTec — Bromma, Švédsko), udržujícím pH na konstantní hodnotě (7,0–7,2).

Analytické metody: Růst byl stanoven gravimetricky, lysin manometricky [6]. Spotřeba sacharosy během fermentace byla stanovována za použití přístroje Glucose Analyzer (Beckman, USA). pH bylo měřeno pH-metrem OP-208 (Radelkis, MLR).



Obr. 1. Fermentace lysinu u *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100/Leu-6 v 20litrovém tanku

L — lysin (g.l⁻¹), W — sušina (g.l⁻¹), S — sacharosa (g.l⁻¹)
1 — sušina, 2 — lysin, 3 — pH, 4 — sacharosa

VÝSLEDKY A DISKUSE

Byly izolovány mutanty *C. glutamicum* 9366-AEC/100 dependentní na adenin, alanin, leucin a serin, které byly produkčně hodnoceny, a to v baňkách inkubovaných na rotační třepačce při 28 °C 4 dny. Výsledky izolace a produkčního hodnocení jsou uvedeny v tab. 1.

Z 3 524 testovaných kolonií bylo izolováno 38 mutant (1,1 %), které kromě rezistence vůči AEC a dependenci na homoserin vyžadovaly k růstu další složky (uvedené v tabulce). 13 mutant produkovalo lysin v koncentracích 31–35 g/l — většina z nich byla dependentní na leucin, což se shoduje s výsledky, dosaženými s AEC^r, Leu⁻ — mutantami *Brevibacterium lactofermentum* [1].

Z každé skupiny byla vybrána mutanta s maximální produkcí a ta byla srovnávána s produkcí kontroly, tj.

Tab. 1. Izolace lysin produkujících mutant *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100 dependentních na adenin (alanin, leucin, serin)

	Mutanty dependentní na			
	Ade	Ala	Leu	Ser
Počet otestovaných kolonií	926	654	824	1 120
Počet izolovaných mutant	5	11	15	7
Podíl izolovaných mutant (%)	0,54	1,68	1,82	0,63
Počet mutant produkujících lysin v množství:				
20–25 g/l	2	3	4	2
26–30 g/l	2	2	4	0
31–35 g/l	0	4	6	3

Ade — adenin, Ala — alanin, Leu — leucin, Ser — serin

s produkci výchozího mutantního kmene *C. glutamicum* 9366-AEC/100 [tab. 2].

Maximální produkce byla zaznamenána u mutanty *C. glutamicum* 9366-AEC/100/Leu-6 (33,8 g/l, tj. 114,6 % kontroly), která kultivována v 20-l tanku produkovala 47 g/l lysinu (graf 1), což je produkce srovnatelná s produkcí, uváděnou pro AEC⁺, Leu⁻ — mutanty *B. lactofermentum* [2].

Tab. 2. Produkce lysinu u vybraných mutant *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100 dependentních na aminokyseliny a složky nukleových kyselin

Mutanta	Produkce po 4 dnech kultivace (g/l)
<i>C. glutamicum</i> 9366-AEC/100/Ade-4	28,3
Ala-4	31,4
Leu-6	33,8
Ser-7	31,5
<i>C. glutamicum</i> 9366-AEC/100	29,5

Protože s mutantou *C. glutamicum* 9366-AEC/100/Leu-6 bylo dosaženo relativně vysokých produkci v médiu se sacharosou, byla u této mutanty ověřována také produkce v médiích s ethanolem a octovou kyselinou, aby bylo možno srovnat produkce v médiích s různými zdroji uhlíku.

V 2-l tancích byl vypracován postup fermentační přípravy lysinu, při kterém bylo do média B-F-E přidáváno od 8. hodiny kultivace v šestihodinových intervalech 10 ml ethanolosacharosové směsi s podíly ethanolu a sacharosy uvedenými v tab. 3 (směs ještě obsahovala 10 % octové kyseliny, jejíž množství však měněno nebylo).

Tab. 3. Vliv složení ethanolosacharosové směsi na produkci lysinu u mutanty *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100/Leu-6 kultivované v médiu B-F-E

Podíl ethanolu ve směsi (%)	Podíl sacharosy ve směsi (%)	Produkce po 4 dnech kultivace (g/l)
50	10,0	22,5
60	10,0	23,9
70	10,0	23,4
80	10,0	17,2
50	5,5	18,3
50	7,0	22,8
50	8,5	21,6
50	10,0	20,7

Maximální produkce (23,9 g/l) byla dosažena při aplikaci směsi složené z 60 % ethanolu, 10 % sacharosy a 10 % octové kyseliny.

Tato směs byla užita při fermentacích v 20-l tancích, plněných médiem B-F-E, které byly vybaveny analyzátozem Metrex, spojeným s pH-statem, dávkujícím ethanolosacharosovou směs. Toto zařízení umožňuje udržení konstantní koncentrace ethanolu (0,5 %) a pH (7,0) po celou dobu kultivace. V médiu B-F-E, doplňovaném během kultivace ethanolosacharosovou směsí, produkovala mutantka *C. glutamicum* 9366-AEC/100/Leu-6 po 4 dnech kultivace 21,5 g/l lysinu.

Při ověřování možnosti náhrady sacharosy octovou kyselinou a octany bylo s mutantou *C. glutamicum* 9366-AEC/100/Leu-6 dosaženo v médiu B-F-A produkce 36,5 g/l lysinu, a to po 4denní kultivaci v 2-l tancích, které byly během fermentace doplňovány v šestihodinových intervalech (od 24. hodiny) 15 ml sacharosoacetátové směsi, složené z 25 % sacharosy, 25 % octové kyseliny a 6,2 % octanu amonného.

V pokusech prováděných v 20-l tancích, plněných médiem B-F-A, byl sledován vliv pH a frekvence míchání na výši produkce lysinu (tab. 4). Hodnota pH, stoupající po 8 h kultivace na hodnoty 7,8 až 8,0 v důsledku utilizace acetátu, byla udržována v rozmezí 7,0 až 7,5 automatickým dávkováním sacharosoacetátové směsi za použití pH-statů.

Tab. 4. Vliv pH a frekvence míchání na produkci lysinu u mutanty *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100/Leu-6 kultivované v médiu B-F-A

Frekvence otáček míchání (s ⁻¹)	pH	Produkce po 4 dnech kultivace (g/l)
8,0	7,0	40,5
8,0	7,5	46,7
9,4	7,0	48,2
9,4	7,5	50,8

Maximální produkce (50,8 g/l) byla zaznamenána při frekvenci otáček 9,4 s⁻¹ a při pH 7,5. Při vyšší frekvenci otáček bylo dosaženo zvýšení o 8 až 9 % — výše produkce lysinu v médiu s acetátovými ionty je závislá na intenzitě míchání. K stejnému závěru (stimulace produkce intenzivnějším vzdušněním v acetátovém médiu) dospěli při fermentaci threoninu AKASHI et al. [7].

Literatura

- [1] TOSAKA, O., TAKINAMI, K., HIROSE, Y.: Agric. Biol. Chem., **42**, 1978, s. 1181
- [2] TOSAKA, O., HIRAKAWA, H., YOSHIHARA, Y., TAKINAMI, K., HIROSE, Y.: Agric. Biol. Chem., **42**, 1978, s. 1773
- [3] PELECHOVÁ, J., PLACHÝ, J., SMÉKAL, F.: Kvas. prům., **27**, 1981, s. 64
- [4] PLACHÝ, J., ULBERT, S.: Kvas. prům., **31**, 1985, s. 159
- [5] Čs. patent 142 889
- [6] GALE, E. F.: V Advances in Enzymology (F. F. Nord, ed.), vol. 24, Interscience Publishers, Inc., New York, 1946, s. 1
- [7] AKASHI, H., SHIBAI, H., HIROSE, Y.: Agric. Biol. Chem., **43**, 1979, s. 1563

Lektorovala Ing. Jana Pelechová, CSc.

Plachý, J. — Ulbert, S. — Smékal, F.: Využití auxotrofně-regulačních mutant *Corynebacterium glutamicum* při fermentační přípravě lysinu. Kvas. prům., **34**, 1988, č. 11, s. 328—329.

Eyla izolována mutantka *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100/Leu-6, rezistentní vůči S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu a dependentní na homoserin a leucin, produkuji v médiích se sacharosou, ethanolem nebo octovou kyselinou jako zdroji uhlíku 47,0, 21,5 a 50,8 g/l lysinu.

Плахи, И. — Ульберт, С. — Смёкал, Ф.: Использование ауксотрофно-регуляторных мутантов *Corynebacterium glutamicum* в приготовлении лизина ферментативным путем. Квас. прум., **34**, 1988, № 11, стр. 328—329.

Byl získán mutant *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100/Leu-6, устойчивый против S-(2-аминоэтил)-L-цистеина, нуждающийся в гомосерине и лейцине и образующий в средах со сахарозой, этанолом или уксусной кислотой в качестве источников углерода 47,0, 21,5 и 50,8 г/л лизина.

Plachý, J. — Ulbert, S. — Smékal, F.: An Application of Auxotrophic-Regulatory Mutants of *Corynebacterium glutamicum* for a Preparation of Lysine by Fermentation. Kvas. prům., **34**, 1988, No. 11, pp. 328—329.

There has been isolated the mutant *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100/Leu-6, resistant to S-(2-aminoethyl)-L-cysteine and dependent to homoserine and leucine, producing 47,0, 21,5 and 50,8 g/l lysine in media containing sucrose, ethanol or acetic acid as carbon sources.

Plachý, J. — Ulbert, S. — Smékal, F.: Anwendung der auxotroph-regulierbaren Mutanten von *Corynebacterium glutamicum* für eine fermentative Herstellung von Lysin. Kvas. prům., **34**, 1988, Nr. 11, s. 328—329.

Es wurde isoliert die Mutante *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100/Leu-6, welche resistent gegen S-(2-aminoethyl)-L-Cysteine ist und Homoserin und Leucin für sein Wachstum bedürft. Diese Mutante in Medien, enthaltenden solche Kohlenstoffquellen als Saccharose, Äthanol oder Essigsäure, produzierte 47,0, 21,5 und 50,8 g/l Lysin.