

Využití mutanty *Corynebacterium glutamicum* citlivé vůči fluorpyruvatu při fermentační přípravě lysinu v médiích s melasou

579 663

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

Klíčová slova: *Corynebacterium glutamicum*, fermentace, lysin, fluorpyruvat, melasa

Při studiu úlohy biotinu v biosyntéze lysinu u koryneformních bakterií bylo zjištěno, že výši produkce lysinu ovlivňují nejen enzymy podílející se přímo na jeho biosyntéze, ale i enzymy uplatňující se při metabolické přeměně glukosy na asparagovou kyselinu, z níž biosyntéza lysinu vychází [1, 2]. Kromě aspartatkinasy a homoserindehydrogenasy rozhoduje tedy o výši produkce také poměr pyruvatdehydrogenasy a pyruvatkarboxylasy. V přítomnosti fluorpyruvatu, kompetitivního inhibitoru pyruvatdehydrogenasy [3] a vysokých koncentrací biotinu v médiu, je fosfoenolpyruvat karboxylován na oxalocetovou kyselinu, z níž se tvoří asparagová kyselina. Ta inhibuje fosfoenolpyruvatkarboxylasu a umožňuje tak přednostní přeměnu fosfoenolpyruvatu na pyruvat, indukující v přítomnosti nadbytku biotinu tvorbu pyruvatkarboxylasy [4].

Cílem práce byla izolace mutant *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100 citlivých vůči fluorpyruvatu a ověření jejich schopnosti produkovat lysin v médiích s melasou.

MATERIÁL A METODY

Mikroorganismus: Mutantní kmen *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100 rezistentní vůči S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu (AEC₂) a dependentní na homoserin (Hse⁻).

Chemikálie: Mutanty byly indukovány za použití ethylmethansulfonátu (EMS) fy Koch and Light (V. Británie). Mutanty citlivé na fluorpyruvat (FP^s) byly selektovány za použití 3-fluorpyruvatu sodného fy Serva (NSR).

Media: Média pro izolaci mutant (KM, MM) a jejich produkční hodnocení v baňkách a tancích (CSL-B a CSL-B-S; B a B-F) byla užita již dříve [5]. Pro ověření vhodnosti melasy jako zdroje uhlíku bylo užito médií CSL-B-Me (inokulační), B-Me a B-F-Me (produkční) tohoto složení (g/100 ml): médium CSL-B-Me: sacharosa — 2,5, melasa — 1 a kukuřičný výluh („corn-steep liquor“, CSL, 65 % sušiny) — 5; médium B-Me: sacharosa — 10, melasa — 10, kyselý hydrolyzát arašídové mouky (HAM) — 18 (% obj.), CSL — 1, (NH₄)₂SO₄ — 1, KH₂PO₄ — 0,1, MgSO₄ · 7H₂O — 0,15, CaCO₃ — 3; médium B-F-Me: melasa — 30, HAM — 18, CSL — 1, (NH₄)₂SO₄ — 1,6, KH₂PO₄ — 0,1, MgSO₄ · 7H₂O — 0,01; pH všech médií bylo po sterilaci (120 °C, 30 min) 7,0 až 7,2.

Izolace: Mutanty byly indukovány dlouhodobým působením EMS (50 mmol/l, 18 h) a s použitím otiskové metody byly selektovány na plotnách s MM doplněným AEC, homoserinem a 3-fluorpyruvatem sodným (FP).

Kultivace: V baňkách a tancích byla popsána již dříve [5].

Analytické metody: Růst byl stanoven gravimetricky, lysin manometricky, spotřeba sacharidu za použití Glucose Analyzer 2 (Beckman, USA), pH na pH-metru OP-208 (Radelkis, MLR).

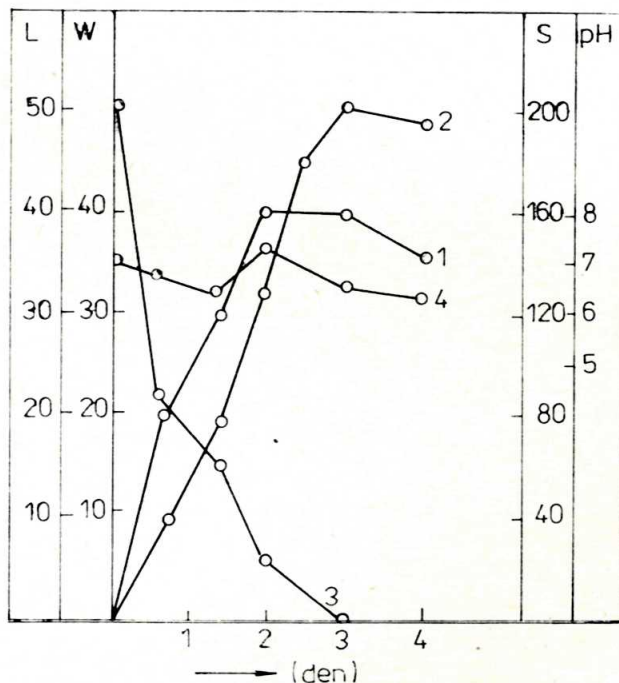
VÝSLEDKY A DISKUSE

Byly izolovány mutanty *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100 citlivé vůči fluorpyruvatu (FP^s-mutanty). Ty byly — po ověření stupně citlivosti vůči FP — produkčně hodnoceny v baňkách v médiu B, zaočkovaném inokulem vyrostlým v médiu CSL-B. Výsledky izolace, distribuce mutant podle stupně citlivosti a výše produkce lysinu jsou shrnuty v tab. 1.

Tab. 1. Izolace lysin produkujících mutant *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100 citlivých vůči fluorpyruvatu

Počet testovaných kolonií	1 160
Počet izolovaných mutant	16
Podíl izolovaných mutant (%)	1,38
Podíl mutant citlivých vůči 1 µg/ml FP	12
10 µg/ml	4
Počet mutant produkujících 30–35 g/l lysinu	6
36–40 g/l	3
41–45 g/l	1

Maximální produkce (42 g/l) byla dosažena u mutantu *C. glutamicum* 9366-AEC/100/FP-1, citlivé vůči 1 µg/ml. Vybraná mutanta kultivována v tanku o objemu 20 l v médiu B-F dosáhla po 3 dnech kultivace produkce 49,5 g/l lysinu (obr. 1).



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

L — lysin (g/l), W — sušina (g/l), S — sacharid (g/l)
1 — sušina, 2 — lysin, 3 — sacharid, 4 — pH

Vysoké produkce lysinu, zaznamenané i na laboratorní úrovni (kultivace v baňkách) a srovnatelné s produkcemi, které uvádějí pro FP^s-mutanty *Brevibacterium flavum* Ozaki a Shio [6], interpretují Tosaka et al. [4] synergistickým účinkem fluorpyruvatu a nadbytku biotinu na výši produkce lysinu u FP^s-mutant korynebakterií.

Relativně vysoké koncentrace biotinu, které lze předpokládat v médiích B a B-F, obsahujících HAM a CSL,

role biotinu v biosyntéze lysinu a vliv biotinu v melase na výši produkce — to vše navozovalo srovnání produkce lysinu u mutant druhu *Brevibacterium flavum* resistentních vůči antibiotikům (penicilinu, bacitracinu) a mutant vyrostlých v médiích s vysokým obsahem melasy [7] s produkcí mutantu *C. glutamicum* 9366-AEC/100/FP-1, a to při submerzní kultivaci v baňkách s médiem B-Me (tab. 2).

U mutantu *C. glutamicum* 9366-AEC/100/FP-1 byla zjištěna maximální produkce (35,6 g/l). Mutanta byla použita při kultivaci v tancích 20 l plněných médiem B-F-Me, při níž byl sledován vliv různých koncentrací melasy, hydrolyzátu arašídové mouky, kukuřičného výluhu a síranu amonného na výši produkce lysinu (tab. 3).

Maximální produkce (49,5 g/l), zjištěná v médiu B-F-Me s 25 % melasy, 24 % HAM, 1 % CSL a 1,6 % (NH₄)₂SO₄, se vyrovnala produkci zaznamenané touto mutantou v médiu B-F (se sacharosou jako zdrojem uhlíku), avšak dosažené při nižší produkční rychlosti (0,55 g/h ve srovnání s 0,69 g/h).

Tab. 2. Produkce lysinu dosahované jednotlivými produkčními kmeny v médiu B-Me

Mutanta	Genetické znaky	Produkce po 4 dnech kultivace (g/l)
B. flavum CB—Ab/256 ¹	AEC ^r , Hse ⁻ , BCT ^r	26,0
Ab/362 ¹	AEC ^r , Hse ⁻ , BCT ^r	31,2
Me/3—60 ²	AEC ^r , Hse ⁻	30,5
C. glutamicum 9366-AEC/100/FP-1	AEC ^r , Hse ⁻ , FP ^s	35,6

¹) Mutanty rezistentní k antibiotikům.

²) Mutanty vyrostlé v médiích s vysokým obsahem melasy.

BCT^r — rezistence vůči bacitracinu.

Tab. 3. Vliv koncentrací melasy, hydrolyzátu arašídové mouky, kukuřičného výluhu a síranu amonného v médiu B-F-Me na výši produkce lysinu dosahovanou mutantou *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100/FP-1

Složky média — [%]				Produkce po 4 dnech kultivace [g/l]
Melasa	HAM	CSL	(NH ₄) ₂ SO ₄	
25	18	1	2,4	40,4
25	24	1	1,6	49,5
30	18	1	2,4	44,6
30	24	1	1,6	42,0
30	18	1,5	2,4	43,0
40	18	1,5	2,4	41,7

Literatura

- [1] TOSAKA, O. - HIRAKAWA, H. - TAKINAMI, K.: Agric. Biol. Chem. **43**, 1979a, s. 491.
- [2] TOSAKA, O. - MORIOKA, H. - TAKINAMI, K.: Agric. Biol. Chem. **43**, 1979b, s. 1513.
- [3] BISSWANGER, H.: J. Biol. Chem. **256**, 1981, s. 815.
- [4] TOSAKA, O. - YOSHIHARA, Y. - IKEDA, S. - TAKINAMI, K.: Agric. Biol. Chem., **49**, 1985, s. 1305.
- [5] PLACHÝ, J. - ULBERT, S.: Kvas. prům., **31**, 1985, s. 159.
- [6] OZAKI, H. - SHIO, I.: Agric. Biol. Chem., **47**, 1983, s. 1569.
- [7] PLACHÝ, J. - PALEČKOVÁ, F.: Kvas. prům., **33**, 1987, s. 364.

Lektoroval dr. František Směkal, CSc.

Plachý, J. - Ulbert, S.: Využití mutantu *Corynebacterium glutamicum* citlivé vůči fluorpyruvatu při fermentační přípravě lysinu v médiích s melasou. Kvas. prům., **35**, 1989, č. 4, s. 103—105.

Byla izolována mutanta *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100/FP-1, rezistentní vůči S-2-aminoethyl-L-cysteinu, dependentní na homoserin a citlivá vůči fluorpyruvatu, produkující v médiu s melasou 49,5 g/l lysinu.

Плахи, И. - Ульберт, С.: Использование мутанта *Corynebacterium glutamicum* чувствительного к фторпиру-

вату для приготовления лизина ферментативным путем в средах с мелассой. Квас. прум., 35, 1989, № 4, стр. 103—105.

Был выделен мутант *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100/FP-1 устойчивый прогив S-(2-аминоэтил)-L-цистеина, нуждающийся в гомосерине и чувствительный на фторпируват, который образовал в среде с мелассой 49,5 г/л лизина.

Plachý, J. - Ulbert, S.: An Application of a Mutant *Corynebacterium glutamicum* Sensitive to Fluorpyruvate for a Preparation of Lysine by Fermentation in a Medium with Molasses. Kvas. prům., 35, 1989, No. 4, pp. 103—105.

There has been isolated the mutant *Corynebacterium*

glutamicum 9366-AEC/100/FP-1, resistant to S-/2-aminoethyl/-L-cysteine, dependent to homoserine and sensitive to fluorpyruvate, producing 49,5 g/l lysine in a medium containing molasses.

Plachý, J. - Ulbert, S.: Die Anwendung der Mutante *Corynebacterium glutamicum* empfindlich gegen Fluorpyruvat für eine fermentative Herstellung von Lysin in einem Melassemedium. Kvas. prům., 35, 1989, Nr. 4, S. 103—105.

Es wurde isoliert die Mutante *Corynebacterium glutamicum* 9366-AEC/100/FP-1, welche resistent gegen S-/2-aminoethyl/-L-Cystein ist, bedürft Homoserin und empfindlich gegen Fluorpyruvat ist. Die gennante Mutante produzierte 49,5 g/l Lysin in einem Melassemedium.