



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

199 998

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 10 05 78
(21) PV 2963-78

(51) Int. Cl.³ C 12 N 1/20

(40) Zveřejněno 30 11 79
(45) Vydáno 01 08 83

(75)
Autor vynálezu

PLACHÝ JIŘÍ dr., ROZTOKY U PRAHY, SMÉKAL FRANTIŠEK dr.,
ČULÍK KAREL dr., PRAHA

(54) Způsob šlechtění mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum* a kmen mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum* CCM 3392

1

Vynález se týká způsobu šlechtění mikroorganismu druhu *Corynebacterium glutamicum* a kmene *Corynebacterium glutamicum* CCM 3392, produkujícího lysin v mediu s ethanolem, resistantního k analogu lysinu a k analogu threoninu a dependentního na homoserin.

Nakamori a Shio (Agr. Biol. Chem. 37,635,1973), izolující producenty threoninu, získali mutanty druhu *Brevibacterium flavum*, resistantní k analogu lysinu, t.j. k S-/2-aminoethyl-/L-cysteinu a k analogu threoninu, t.j. ke kyselině α -amino-/3-hydroxyvalerové, které kromě vyšších množství threoninu (10 až 15 g/l) hromadily v mediu také relativně vysoké množství lysinu (9 až 12 g/l). Z producentů lysinu, schopných produkovat lysin v mediu s ethanolem jako hlavním zdrojem C, byly používány jednak mutanty auxotrofní, dependentní na homoserin, threonin a/nebo methionin a schopné hromadit v mediu s ethanolem maximálně 11 až 16,5 g/l lysinu (FR pat. č. 2 021 688), jednak mutanty současně resistantní k analogu lysinu a auxotrofní na aminokyseliny, vitaminy nebo deriváty nukleových kyselin, při čemž však ethanol nebyl jediným zdrojem C (DE pat. č. 2 321 461).

Při hledání vhodných producentů lysinu v mediu s ethanolem jako hlavním zdrojem C byla ověřována možnost aplikace mutant resistantních k analogu lysinu a k analogu threoninu. Byla proto u mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum* CCM 3287, resistantního k S-/2-aminoethyl-/L-cysteinu, dependentního na homoserin a hromadícího v mediu se sacharosou relativně vysoké množství lysinu, indukovaná působením ethylmethansulfonátu resistance na kyselinu α -amino-/3-hydroxyvalerovou.

199 998

Produkci lysinu v mediu s ethanolem převyšuje dosud známé výše smíšené kmeny nový kmen *Corynebacterium glutamicum*, uložený v Československé sbírce mikroorganismů Univerzity J. E. Purkyně v Brně, třída Obránců míru 10, pod označením CCM 3392, který je předmětem vynálezu. Předmětem vynálezu je rovněž způsob šlechtění mikroorganismu druhu *Corynebacterium glutamicum*, kterým se nová mutanta získává a jehož podstata spočívá v tom, že se na kulturu výchozího organismu resistentního na analog lysinu a dependentního na homoserin působí roztokem 0,05 M ethylmethansulfonátu po dobu 18 hod., načež se izolují mutanty vyrostlé ze suspenze po působení mutagenu vyočkováním na plotny s minimálním médiem doplněným 10 mg/ml kyseliny α -amino- β -hydroxyvalerové a 0,001 mg/ml L-homoserinu. S výhodou se používá 0,05 M roztoku ethylmethansulfonátu ve fosfátovém pufru o pH 7,2.

Hlavní výhodou nového kmene podle vynálezu je relativně vysoká produkce lysinu v mediu s ethanolem jako hlavním zdrojem C. Při dvoustupňové kultivaci tohoto kmene v produkčním mediu s octanem sodným, kyselým hydrolyzátem arašidové mouky, kukuřičným výluhem a minerálními solemi, doplňovaným během kultivace ethanolovou směsí bylo po 96 hodinách kultivace dosaženo produkce 20 až 25 g/l lysinu. Předností tohoto kmene je i zvýšená genetická stabilita, podmíněná jednak resistencí ke 2 analogům, jednak auxotrofií, která umožňuje použít s výhodou tento kmen při kontinuální fermentační přípravě lysinu, využívající předností kontinuální kultivace produkčního organismu.

Nový kmen *Corynebacterium glutamicum* CCM 3392 je charakterisován následujícími morfološko-kultivačními a fyziologickými vlastnostmi:

Gram pozitivní, nepohyblivé a nesporulující kokky až krátké tyčinky, velikostí 1,6 x 1,9 až 3,5 μ m, s metachromatickými granuly, vyskytující se jednotlivě, v párech i v nepravidelných shlucích.

Na masopeptonovém agaru tvoří okrouhlé, hladké, lesklé, krémově bílé kolonie s rovnými okraji.

Na masopeptonovém šikmém agaru vytváří intenzivní bílý nárůst po celém povrchu agaru, k pigmentaci nedochází.

Při růstu tohoto organismu v bujónu lze zaznamenat zákal a sediment, blanka se netvoří.

Na krevním agaru tvoří kulaté, hladké, šedé kolonie, s rovnými okraji, nehemolysující.

Fyziologické vlastnosti:

Optimální teplota: 27 až 32 °C

Optimální pH: 7,0 až 7,2

Thermoresistence: 56 °C 1 hod., 80 °C 10 min.

Aerobní organismus

Želatinu nestekucuje.

Lakmusové mléko odbarvuje, ale nesráží.

Glukosu, fruktosu a sacharosu zkvašuje.

Škrob hydrolyzuje jen slabě.

Celulosu nerozkládá.

Dusičnany neredukuje.

Sírovodík netvoří.

Indol netvoří.

Test na katalázu: pozitivní

Test na methylenovou modř: negativní

Voges-Proskauerův test: negativní

K růstu vyžaduje z vitaminů biotin a z aminokyselin homoserin.

Při způsobu šlechtění podle vynálezu se zpravidla postupuje tak, že se výchozí organismus *Corynebacterium glutamicum* CCM 3287, resistentní k S-/2-aminoethyl/-L-cysteinu a dependentní na homoserin, nejprve kultivuje 24 hodin v kompletním mediu, potom se buněčná suspence promyje fosfátovým pufrům o pH 7,2 a vystaví působení mutagenu, v tomto případě působení 0,05 M roztoku ethylmethansulfonátu 18 hodin ve fosfátovém pufru o pH 7,2. Po proběhnutí inkubace se suspensí promytou destilovanou vodou očkují plotny s minimálním mediem s 10 mg/ml α -amino- β -hydroxyvalerové kyseliny a 0,001 mg/ml L-homoserinu. Kolonie, které na plotnách vyrostou, se očkují na šikmé masopeptonové agary. Vyrostlé isoláty se testují na stupeň resistance k S-/2-aminoethyl/-L-cysteinu a ke kyselině α -amino- β -hydroxyvalerové, na dependenci na homoserin a na schopnost produkovat lysin v mediu s ethanolem jako hlavním zdrojem C.

Podrobnosti vynálezu vyplývají z následujících příkladů provedení.

Příklady provedení

Příklad 1

Mikroorganismem *Corynebacterium glutamicum* CCM 3287 resistentním k S-/2-aminoethyl/-L-cysteinu a dependentním na L-homoserin, se naočkuje 60 ml media v 750 ml Erlenmayerově baňce následujícího složení (v g):

glukosa	0,5
hydrolyzátní kaseinu	10,0
výluh z droždí	5,0
prim. fosforečnan draselný	3,0
sek. fosforečnan draselný	1,0
roztok solí	1,0 ml
řasový agar	25,0
voda	1000 ml

(roztok solí je roztok 0,5 g heptahydrátu síranu železnatého a 0,5 g tetrahydrátu síranu manganatého ve 100 ml vody).

Zaočkovaná baňka se inkubuje na reciproké třepačce (počet kyvů - 91/min., délka kyvu - 9 cm) při 28 °C 24 hodin. Buněčná suspence se potom promyje fosfátovým pufrům (pH = 7,2) a po promytí se vystaví 18 hodin působení 0,05 M roztoku ethylmethansulfonátu. Potom se buněčná suspence promyje 2x sterilní, destilovanou vodou, zředí a zředěnou suspensí se očkují plotny s tímto mediem (v g):

glukosa	1,0
---------	-----

199 988

citran sodný	0,4
prim. fosforečnan draselný	7,0
sek. fosforečnan draselný	2,0
síran amonný	1,0
síran hořečnatý kryst.	0,1
roztok solí (jako výše)	1 ml
biotin	2 µg/ml
agar	25,0
destilovaná voda	1000 ml

Medium se doplní 10 mg/ml kyseliny α -amino- β -hydroxyvalerové a 0,001 mg/ml L-homoserinu. Plotny se inkubují při 28 °C 120 hodin a kolonie, které se objeví na povrchu ploten, se očkují na šikmé maso-peptonové agary. Isoláty vyrostlé na agarech se testují na stupeň resistance k S-/2-aminoethyl-/L-cysteinu a ke kyselině α -amino- β -hydroxyvalerové, na dependenci na L-homoserin a na schopnost produkovat lysin v mediu s ethanolem jako hlavním zdrojem C.

Příklad 2

Kulturou kmene *Corynebacterium glutamicum* CCM 3392 24 hodin starou, se očkuje 60 ml inokulačního media v 500 ml varných bankách následujícího složení (v g):

octan sodný	15,0
sacharosa	20,0
kukuřičný výluh (60% suš.)	30,0
voda	1000 ml
pH	7,0

Sterilizace při 120 °C 30 min. Zaočkované banky se inkubují na rotační třepačce (240 obr./min., výstředník - 2,5 cm) po dobu 18 hodin při 29 °C. Narostlou kulturou se v množství 2 ml (10% obj.) očkují 500 ml varné banky s 20 ml produkčního media následujícího složení (v g):

octan sodný	20,0
kukuřičný výluh (60 % suš.)	10,0
kyselý hydrolyzátní arašidový	
mouky	150,0 ml
síran amonný	10,0
prim. fosforečnan amonný	1,0
síran hořečnatý kryst.	0,1
uhlíkatý vápenatý mletý	30,0
voda	1000 ml
pH	7,0

Sterilizace při 120 °C 30 min. Zaočkované banky se inkubují na rotační třepačce (počet obrátek a výstředník - viz výše) při 29 °C po dobu 96 hodin. Po 6 až 8 hodinách kultivace, kdy se spotřebuje acetal a pH kultivační tekutiny dosáhne hodnot 7,8 až 8,0, se přidává do

baněk v 6tihodinových intervalech v množství 0,5 až 0,7 ml ethanolová směs, dodávající nejen zdroj C, ale současně i upravující pH kultivační tekutiny na hodnoty 6,8 až 7,0. Tato ethanolová směs se sterilizuje filtrací přes filtr G5 (Jena-Glass) a má následující složení:

ethanol čistý	60,0 ml
kyselina octová ledová	10,0 ml
sacharosa	6,6 g
voda	100 ml

Produkce lysinu v 96. hodině kultivace je 25 g/l.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob šlechtění mikroorganismu druhu *Corynebacterium glutamicum*, vyznačující se tím, že se na kulturu výchozího mikroorganismu resistantního k analogu lysinu a dependentního na homoserin působí 0,05 M roztokem ethylmethansulfonátu po dobu 16 až 20 hodin, načež se izolují získané mutanty, vyrostlé po vyočkování suspense po působení mutagenu na minimálním mediu doplněném 10 mg/ml kyseliny α -amino- β -hydroxyvalerové a 0,001 mg/ml L-homoserinu.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se působí 0,05 M roztokem ethylmethansulfonátu ve fosfátovém pufru o hodnotě pH 7,2.

3. Kmen mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum* CCM 3392, produkující lysin v mediu s ethanolem jako hlavním zdrojem C, resistantní k analogu lysinu a k analogu threoninu a dependentní na homoserin, získaný způsobem podle bodu 1.