



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

202 371

(11) (B1)

[51] Int. Cl.³

C 12 N 15/00

(22) Přihlášeno 10 11 78

(21) PV 7345-78

(40) Zveřejněno 30 04 80

(45) Vydáno 30 08 82

(75)

Autor vynálezu

PLACHÝ JIŘÍ, RNDr., CSc., Roztoky u Prahy,
ULBERT STANISLAV, Ing. a ČULÍK KAREL, RNDr., Praha

(54) Způsob šlechtění mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum*
a kmen *Corynebacterium glutamicum* CCM 3358

1

Vynález se týká způsobu šlechtění mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum* a kmene mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum* CCM 3358, rezistentního k vyšším koncentracím indolu a produkujícího v mediu s vhodným zdrojem uhlíku, dusíku a minerálních živných solí, jež je během kultivace doplňováno indolem, relativně vysoká množství L-tryptofanu.

Fermentačně lze tryptofan připravit buď aplikací vhodných kmenů kvasinek (kmene druhu *Hansenula anomala*), izolovaných z přirozených materiálů a schopných přeměňovat metabolické prekursor tryptofanu (kyselina anthranilová, indol) na L-tryptofan (Enatsu se sp., J. Ferment. Technol. 41, 500, 1963) nebo použitím mutant bakterií (mutanty *Escherichia coli*, *Brevibacterium flavum*), rezistentních k analogům tryptofanu nebo k analogům tryptofanu a fenylalaninu, které v mediu s vhodným zdrojem uhlíku, dusíku a s minerálními živnými solemi hromadí přímo L-tryptofan (Lim-Matelles, Science 140, 388, 1963; Shiio se sp., Agr. Biol. Chem. 39, 627, 1975). Nicméně produkce zaznamenané jak při aplikaci kvasinek tak při aplikaci mutant bakterií jsou relativně nízké (3 až 6 g/litr) a tedy neperspektivní z hlediska fermentační přípravy tryptofanu v provozním měřítku. Byl proto hledán produkční organismus s relativně vysokou produkcí L-tryptofanu, které by bylo možno dosáhnout v poměrně krátké době.

2

Výši produkce tryptofanu převyšuje výše zmíněné a dosud známé produkční mikroorganismy nový kmen mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum*, uložený v Československé sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně v Brně, třída Obránců míru 10, pod označením CCM 3358, jenž je předmětem vynálezu.

Předmětem vynálezu je také způsob šlechtění mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum*, jímž byl nový kmen získán a jehož podstata spočívá v tom, že se na kulturu výchozího prototrofního mikroorganismu působí 0,05 M roztokem ethylmethan-sulfonátu po dobu 18 hodin, načež se izolují získané mutanty vyrostlé po vyočkování suspenze po působení mutagenu na minimálním mediu s obsahem 500 µg/ml indolu.

Hlavní výhodou nového kmene podle vynálezu je podstatné zvýšení produkce tryptofanu, podmíněná rezistencí na indol a z toho plynoucí zvýšená asimilace indolu. S tímto kmenem byl vypracován postup fermentační přípravy tryptofanu, ověřený v měřítku 5000-litrových fermentačních tanků, při němž bylo za aerobních podmínek při kultivaci v mediu s vhodnými zdroji uhlíku, dusíku a minerálních živných solí s doplňovaného v průběhu kultivace indolem, při udržování pH na neutrální hodnotě, po 54 hodinách trvání, dosaženo průměrné produkce L-tryptofanu 10 g/litr.

Nový kmen *Corynebacterium glutamicum* CCM 3358 je charakterizován následujícími morfologickými, kultivačními a fyziologickými vlastnostmi: grampozitivní, nepohyblivé a nesporulující kokky až krátké tyčinky, velikosti 1,6 × 1,9 až 3,5 mm, s metachromatickými granuly, vyskytující se jednotlivě, v párech i 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 v bujónu lze zaznamenat zákal a sediment, blanka se netvoří. Na krevním agaru tvoří kulaté, hladké, šedé kolonie, s rovnými okraji, nehemolyzující.

Fyziologické vlastnosti:

Optimální teplota: 27 až 32 °C

Optimální pH: 7,0 až 7,2

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

Aerobní organismus

Želatinu neztékucuje

Lakmusové mléko odbarvuje, ale nesráží
Glukosu, fruktosu, sacharosu a maltosu zkvašuje

Škrob hydrolyzuje slabě

Celulozu nerozkládá

Dusičnany neredukuje

Sirovodík netvoří

Indol netvoří

Test na katalázu: pozitivní

Test na methylenovou modř: negativní

Voges-Proskauerův test: negativní

K růstu vyžaduje biotin

Při způsobu šlechtění podle vynálezu se postupuje tak, že se výchozí prototrofní organismus *Corynebacterium glutamicum* kultivuje 24 hodin v kompletním mediu a narostlá buněčná suspenze — po promytí fosfátovým pufrům o pH 7,2 — se vystaví působení mutagenu, v tomto případě 0,05 M roztoku ethylmethansulfonátu ve fosfátovém pufru (pH=7,2). Suspenze po působení mutagenu se promyje destilovanou vodou; promytá a vhodně zředěná suspenze se očkuje na plotny s minimálním mediem obsahujícím 500 µg/ml indolu. Kolonie vyrostlé na plotnách se očkují na šikmé masopeptonové agary a vyrostlé izoláty se testují na stupeň rezistence na indol a na schopnost produkovat tryptofan.

Podrobnosti vynálezu vyplývají z následujících příkladů provedení.

Příklady provedení

Příklad 1

Prototrofním organismem *Corynebacterium glutamicum* se očkuje 60 ml media v 750 ml Erlenmayerově baňce tohoto složení (v % hmotn.):

glukosa	0,05
hydrolyzát kaseinu	1,0
výluh z droždí	0,5
prim. fosforečnan draselný	0,3
sek. fosforečnan draselný	0,1

roztok solí	0,1 (% obj.)
řasový agar	2,5

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

Po zaočkování se kultura inkubuje na reciproké třepačce (počet kyvů 91 za min., délka kyvu 9 cm) 24 hodin při 28 °C. Buněčná suspenze se potom promyje fosfátovým pufrům (pH=7,2) a po promytí se vystaví na dobu 18 hodin působení 0,05 M roztoku ethylmethansulfonátu ve fosfátovém pufru (pH=7,2). Potom se buněčná suspenze promyje 2-krát sterilní destilovanou vodou a po vhodném zředění se použije k očkování ploten s minimálním mediem tohoto složení (v % hmotn.):

glukosa	0,1
citronan sodný	0,04
prim. fosforečnan draselný	0,7
sek. fosforečnan draselný	0,2
síran amonný	0,1
síran hořečnatý kryst.	0,01
roztok solí (jako výše)	0,1 (% obj.)
biotin	0,002
agar	2,5

Medium se doplní 500 µg/ml indolu. Plotny se inkubují 120 hodin při 28 °C a kolonie vyrostlé na plotnách se vyočkují na šikmé masopeptonové agary. Izoláty vyrostlé na agarech se testují na stupeň rezistence na indol a na schopnost produkovat tryptofan.

Příklad 2

Inokulační medium, obsahující 2 % hmotn. sacharosy, 1,5 % hmotn. kukuřičného výluhu (65 % hmotn. sušiny), pH=7,0, umístěné v 750 ml Erlenmayerově baňce, se očkuje 24 hodin starou kulturou kmene *Corynebacterium glutamicum* CCM 3358, vyrostlou na šikmém masopeptonovém agaru a inkubuje se na reciproké třepačce (počet kyvů 91 za min.), délka kyvu 9 cm/24 hodin při 28 °C.

Vyrostlou kulturou se očkuje 10 litrů inokulačního media, obsahujícího 2 % hmotn. sacharosy, 1,5 % hmotn. kukuřičného výluhu (65 % sušiny), 0,003 % technického biotinu (1 % účinné látky) a 0,1 % hmotn. sojového oleje, pH=7,8, umístěného v očkovacím tanku o objemu 20 litrů a v němž probíhá kultivace při 29 °C a vzdušnění 0,6 objemu vzduchu/objem media/min. a míchání 400 ot/min. po dobu 14 hodin.

Získaným inokulem se v množství 1 litr očkuje 10 litrů produkčního media v dalším tanku o objemu 20 litrů, tohoto složení (v % hmotn.)

sacharosa	20,0
kukuřičný výluh (65 % sušiny)	6,0
chlorid amonný	2,4
prim. fosforečnan draselný	0,24
síran hořečnatý kryst.	0,012
techn. biotin (1 % úč. látky)	0,003
sojový olej	0,2
pH	7,0 až 7,2

Kultivace ve fermentačním tanku probíhá při 29 °C a vzdušnění 0,6 objemu vzduchu/objem média/min. a míchání 400 ot/min. V průběhu kultivace se upravuje pH ve dvouhodinových intervalech čpavkem na hodnotu 7,2 až 7,5. Od 18. hodiny kultivace se dává 25% roztok indolu v oleji v množství 0,1 % hmotn./objem, v hodinových intervalech, a to tolik dávek, aby hladina

indolu, analyticky sledovaná, nepřevýšila koncentrací 1 mg/ml. V průběhu kultivace se též podle výsledků analýz přidává sacharosa ve formě 70% roztoku, a to v množství 3 % hmotn./objem média. Podle potřeby se kultivační médium odpěňuje sojovým olejem. Doba kultivace je 54 hodin. Produkce L-tryptofanu, stanovená spektrofotometricky, činí 10,8 g/litr.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob šlechtění mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum* vyznačující se tím, že se na kulturu výchozího prototrofního mikroorganismu působí 0,05 M roztokem ethylmethansulfonátu po dobu 18 hodin, načež se izolují získané mutanty, vyrostlé po vyočkování suspenze po působení mutagenu na minimálním médiu s obsahem 500 µg/ml indolu.

2. Kmen mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum* CCM 3358, získaný způsobem

bodu 1, který je rezistentní k indolu a vhodný pro fermentační přípravu L-tryptofanu při submerzní aerobní kultivaci v médiu s vhodným zdrojem uhlíku a dusíku a s minerálními živnými solemi, při neutrální hodnotě pH po celou dobu kultivace, s použitím indolu jako prekurzoru L-tryptofanu, produkující nejméně 10 g L-tryptofanu v 1 litru média.