



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

246668

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 1/20

(22) Přihlášeno 30 04 85

(21) PV 3171-85

(40) Zveřejněno 13 03 86

(45) Vydáno 15 10 87

(75)

Autor vynálezu

PLACHÝ JIŘÍ dr. CSc., ROZTOKY u Prahy, ULBERT STANISLAV ing.,
ČULÍK KAREL dr., PRAHA, BUČKO MICHAL ing. CSc.,
HANO ALEXANDER, BANSKÁ BYSTRICA, BARTA MIROSLAV dr., PRAHA,
MIKLÁŠ EMIL ing., BANSKÁ BYSTRICA

(54) Kmen mikroorganismu *Brevibacterium flavum* CCM 3868

Účelem řešení je produkce esenciální aminokyseliny lysinu v mediu s melasou jako zdrojem uhlíku. Lysin syntetizuje a v mediu hromadí mutanta bakteriálního druhu *Brevibacterium flavum*. Působením mutagenu a aplikací medií se zvyšující se koncentrací melasy byla izolována mutanta rezistentní k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu, dependentní na homoserin a leucin a rostoucí v mediu s vysokým obsahem melasy, která kultivována 96 h v mediu s melasou jako zdrojem uhlíku, hydrolyzátem arašidové mouky jako zdrojem dusíku a s minerálními solemi za aerobních podmínek při 28 °C a neutrálním pH hromadila v prostředí 46 g/l L-lysinu. Lysin, využívaný především jako doplněk krmiv, lze takto vyrábět s využitím mikroorganismů běžnými technologickými postupy.

Vynález se týká nového kmene mikroorganismu druhu *Brevibacterium flavum*, rezistentního k analogu lysinu a dependentního na homoserin a leucin, rostoucího v mediu s vysokým obsahem melasy a hromadícího v mediu s melasou jako zdrojem uhlíku a kyselým hydrolyzátem arašídové mouky a síranem amonným jako zdroji dusíku za aerobních podmínek a při neutrálním pH vysoká množství lysinu.

Vhodnými producenty lysinu, využívanými při jeho výrobě fermentační cestou, jsou regulační mutanty koryneformních bakterií, selektované jako mutanty rezistentní k analogům aminokyselin a dependentní zároveň na aminokyseliny. Takovými mutanty jsou např. mutanty *Brevibacterium lactofermentum* rezistentní k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu a dependentní na alanin nebo leucin a hromadící v glukosovém mediu 30-40 g/l lysinu (Tosaka, O.-Takinami, K.-Hirose, Y.: Agr. Biol. Chem. 42:1 181, 1978; Tosaka, O.-Enei, H.-Hirose, Y.: Trends in Biotechnology 1:70, 1983).

Při fermentační přípravě lysinu s použitím melasy jako zdroje uhlíku lze použít mutanty druhu *Brevibacterium flavum* a *Corynebacterium glutamicum*, které kromě rezistence k analogům aminokyselin a dependence na aminokyseliny byly ještě rezistentní k antibiotikům, např. k penicilinu nebo bacitracinu (US pat. 3 687 810, 1972; švýc. pat. 535 831, 1973). Produkce lysinu dosahované mutanty *Brevibacterium flavum* kolísaly v rozmezí 30-35 g/l.

Produkcí lysinu převyšuje dosud známé zmíněné kmeny nový kmen *Brevibacterium flavum*, uložený v Československé sbírce mikroorganismů Univerzity J. E. Purkyně v Brně, třída Obránců míru 10, pod označením CCM 3 868, který je předmětem vynálezu.

Hlavní výhodou nového kmene podle vynálezu je jeho schopnost růst v mediu s relativně vysokým obsahem melasy a v mediu s melasou jako zdrojem uhlíku produkovat lysin v relativně vysokých množstvích. Při kultivaci nového kmene v produkčním mediu s melasou, kyselým hydrolyzátem arašídové mouky a síranem amonným jako zdroji dusíku a minerálními solemi v baňkách inkubovaných na rotační třepačce při 28 °C a pH udržovaném vodným roztokem čpavku na pH 7,0 lze dosáhnout po 4denní kultivaci produkce lysinu 46 g/l.

Nový kmen *Brevibacterium flavum* CCM 3 868 je charakterizován následujícími morfologicko-kultivačními a fyziologickými vlastnostmi:

Grampozitivní, nepohyblivé, nesporulující kokky až krátké tyčinky.
Na masopectonovém agaru tvoří okrouhlé, hladké, žluté kolonie s rovnými okraji.
Na krevním agaru tvoří okrouhlé, žluté kolonie s rovnými okraji, které nehemolyzují.
Při růstu v bujónu dochází k tvorbě zákalu a sedimentu, ne však blanky.

Fyziologické vlastnosti:

Optimální teplota: 28-30 °C.
Optimální pH: 6,8-7,2.
Aerobní organismus.
Želatinu neztékucuje.
Celulózu nerozkládá.
Glukózu, fruktózu, sacharózu zkvašuje.
Škrob hydrolyzuje jen slabě.
Dusičnany redukuje.
Sirovodík netvoří.
Indol netvoří.
Test na katalázu: pozitivní.
Voges-Proskauerův test: negativní.
K růstu vyžaduje z vitamínů biotin a thiamin, z aminokyselin homoserin a leucin.
Je schopen růst v mediu se 60 % melasy.

Výchozí kmen, *Brevibacterium flavum* CCM 3 736, rezistentní k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu

a dependentní na homoserin a leucin, se submerzně kultivuje 24 h v kompletním mediu a buněčná suspenze po promytí fosfátovým pufrem (pH 7,2) se vystaví 18hod. působení 0,05M roztoku ethylmethansulfonátu ve fosfátovém pufru (pH 7,2). Buněčná suspenze po aplikaci mutagenu se promyje sterilní destilovanou vodou a 5 % (obj.) promyté suspenze se očkují baňky s kompletním médiem, které se inkubují 24 h. 24hod. kulturou se očkují baňky s médiem MeM, obsahujícím 50 % melasy, a to 1 % (obj.) inokula.

Po 4 dnech kultivace se kultura přeočkuje (opět použito 1% inokula) do baněk s médiem MeM se 60 % melasy. Po 4denní kultivaci se kultura vyočkuje na plotny s kompletním médiem. Kolonie vyrostlé po 2 dnech na plotnách se vyočkují na šikmé agary a izoláty vyrostlé na šikmých masopeptonových agarech se jedná testují na stupeň rezistence k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu a na dependenci na homoserin a leucin, jedná se zjišťuje jejich schopnost produkovat lysin v mediu s melasou jako zdrojem uhlíku.

Podrobnosti vynálezu vyplývají z následujících příkladů provedení:

P ř í k l a d 1

Mikroorganismem *Brevibacterium flavum* CCM 3 736 se očkuje 60 ml kompletního media v 500ml varné baňce. Složení kompletního media je následující:

glukóza	0,5 %
hydrolyzát kaseinu	1,0
kvasničný extrakt	0,5
KH_2PO_4	0,3
K_2HPO_4	0,1
roztok solí	1 ml/1 000 ml media
agar (do tuhých medií)	2,5 %

(Roztok solí je roztok 0,5 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ a 0,5 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ve 100 ml vody.)

Zaočkovaná baňka se inkubuje na rotační třepačce (frekvence otáček - 3,7, výstředník - 25 mm) 24 h při 28 °C. Buněčná suspenze se potom 2x promyje fosfátovým pufrem (pH 7,2) a po promytí se vystaví 18hod. působení 0,05M roztoku ethylmethansulfonátu ve fosfátovém pufru (pH 7,2). Po aplikaci mutagenu se suspenze 2x promyje sterilní destilovanou vodou a 5% (obj.) suspenze se očkuje 500 ml varná baňka se 60 ml kompletního media, která se inkubuje 24 h při 28 °C na rotační třepačce. 1 % (obj.) kultivační tekutiny se očkuje 500 ml varná baňka s 20 ml media MeM následujícího složení:

melasa	50,0 %
hydrolyzát arašídové mouky	2,0
močovina	0,5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5
KH_2PO_4	0,04
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,05
CaCO_3	3,0
pH	7,5

Zaočkovaná baňka se inkubuje 4 dny při 28 °C. 1 % (obj.) kultivační tekutiny se opět očkuje 500ml varná baňka s 20 ml media MeM obsahujícího 60 % melasy a buněčnou suspenzí po 4denní inkubaci na rotační třepačce při 28 °C se po naředění očkují plotny s kompletním médiem. Plotny se inkubují při 28 °C 2 dny a kolonie vyrostlé na plotnách se vyočkují na šikmé agary s masopeptonovým médiem. Vyrostlé izoláty se testují na stupeň rezistence k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu, na dependenci na homoserin a leucin a na schopnost produkovat lysin v mediu s melasou jako zdrojem uhlíku.

P ř í k l a d 2

Kulturou kmene *Brevibacterium flavum* CCM 3 868, 24 h starou, se očkuje 60 ml inokulačního media CSL-B-S v 500ml varných baňkách. Stejným způsobem se naočkuje kontrola, tj. výchozí kmen *Brevibacterium flavum* CCM 3 736. Složení inokulačního media je následující:

sacharóza	2,5 %
kukuřičný výluh (65 % sušiny)	3,0
pH	7,0

Zaočkované baňky se inkubují na rotační třepačce (frekvence otáček - 3,7, výstředník - 25 mm) 24 h při 28 °C. 10 % (obj.) inokula se očkují 500 ml varné baňky s 20 ml produkčního media B-Me následujícího složení:

melasa	30,0 %
hydrolyzát arašídové mouky	15 % (obj.)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,5 %
KH_2PO_4	0,2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,03
CaCO_3	2,0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,002
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,002
thiamin (hydrochlorid)	0,0002
biotin (technický)	0,00005
pH	7,0

Během 4denní kultivace se pH upravuje ve 24hod. intervalech vodným roztokem čpavku na hodnotu 7,0-7,2. Na konci kultivace se stanoví obsah lysinu a cukru v kultivační tekutině. Lysin se stanovuje manometricky s použitím dekarboxylázy lysinu a cukr jako glukóza s použitím analyzátoru glukózy Glucose Analyzer 2 (Beckman, U.S.A.).

Produkce lysinu po 4 dnech kultivace činila 46 g/l (produkce kontroly 30 g/l).

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Kmen mikroorganismu *Brevibacterium flavum* CCM 3 868, rezistentní k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu, dependentní na homoserin a leucin, rostoucí v mediu s vysokým obsahem melasy a produkující lysin v mediu s melasou jako zdrojem uhlíku.