



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

199 775

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlásené 30 06 78

(21) FV 4352-78

(51) Int. Cl.³ C 12 N 1/20

(30) Zverejnené 17 09 79

(45) Vydané 01 12 82

(75)
Autor vynálezu

BUČKO MICHAL ing.CSc., HANO ALEXANDER, REVALLOVÁ VIERA ing.,
MIKLÁŠ EMIL ing., HOFBAUER HENRICH ing., BANSKÁ BYSTRICA
SIKYTA BOHUMIL RNDr.CSc., PRAHA
PLACHÝ JIŘÍ RNDr.CSc., ROŽTOKY U PRAHY
ULBERT STANISLAV ing., ČULÁK KAREL RNDr., PRAHA
VANICKÝ MIROSLAV, ROŽTOKY U PRAHY
CHROMÍK JINDŘICH ing., SEVERA ZDENĚK ing., PRAHA

(54) Kmeň mikroorganismu *Brevibacterium flavum* produkující L-lyzín.

1

Vynález sa týka nového kmeňa mikroorganizmu druhu *Brevibacterium flavum*, dependentného na homoserin a rezistentného na analóg lyzínu, hromadiaceho pri kultivácii v médiu s vhodným zdrojom C, zdrojom N a minerálnych solí za aeróbných podmienok a pri neutrálnom pH vysoké množstvo L-lyzínu.

Pri fermentačnej príprave L-lyzínu sa v priemyselnom merítke najčastejšie používali auxotrofné mutanty baktérií, predovšetkým mutanty, ktoré vyžadujú k rastu homoserin. Sano a Shio (Sano, K.-Shio, I.:J. Gen.Appl.Microbiol.16:373.1970) uverejnili prácu, v ktorej popisujú mutanty druhu *Brevibacterium flavum* rezistentné k sirnému analógu lyzínu t.j. k S-(2-aminoetyl) - L-cysteínu (AEC), ktorý hromadí v médiu okolo 32 g/l L-lyzínu. V r. 1973 sa japonským pracovníkom Nakamori a Shio (Nakamori, S. - Shio, I.:Agr. Biol-Chem. 37:653, 1973) podarilo izolovať mutanty *Brevibacterium flavum*, ktoré produkujú lysín (20 g/l) a ktoré boli rezistantné nielen k ABC ale aj k analógu threonínu, t.j. ku kyseline-alfa-amino-beta-hydroxivalérovej. Konečne aj mutanty *Brevibacterium flavum* súčasne rezistentné aj auxotrofné sa osvedčili ako vhodný producenti lyzínu (zapadonemecký patent 2,321.461, 1975), hromadiace v médiu 65 - 70 g/l lyzínu.

Produkcie doposiaľ zmienených známych kmeňov prevyšuje kmeň, ktorý je predmetom tohto vynálezu, a to nový kmeň mikroorganizmu *Brevibacterium flavum*, uložený v česko-

199 775

slovenskej zbierke mikroorganizmov Univerzity J.E. Purkyně v Brne, Tr. Obrátů míru 10 pod označením CCM 251.

Hlavnou výhodou nového kmeňa je zvýšená produkcia L-lyzínu, ktorá je podmienená jednak depenenciou na homoserín, jednak rezistenciou na anológ lyzínu, zistená pri dvojstupňovej kultivácii tohoto kmeňa v produkčnom médiu so sacharózou, kyslým hydrolyzátom arašidovej múky, kukuričným výluhom, minerálnymi soľami, biotínom a thiamínom vo fermentočnom tanku vhod ne vzdušnenom a miešanom, v ktorom je počas kultivácie udržiavané pH ôpavkovou vodou na hodnote 7,0 - 7,5 a teplota na 29 °C - V 96 h. kultivácie boli dosiahnuté produkcie 90 - 96 g/l - L-lyzínu.

Nový kmeň je charakterizovaný týmito morfológicko- kultivačnými a fyziológickými vlastnosťami:

morfológicko-kultivačné vlastnosti:

grampozitívne, nepohyblivé, nesporulujúce koky až krátke tyčinky, vyskytujúce sa jednotlivito aj v nepravidelných zhlukoch, na mäsopeptónovom agare tvoria okrúhle, hladké žlté kolónie s rovnými okrajmi, na mäsopeptónovom šikmom agare vytvárajú intenzívny žltý nárast po celom povrchu agaru; v bujóne možno pozorovať zákal a sediment, blánka sa netvorí

fyziológické vlastnosti:

optimálne pH 6,8 - 7,2

optimálna teplota 28 - 30 °C

aeróbný organizmus

želatínu nestekucuje

celulózu nerozkláda

škrob nehydrolyzuje

skvasuje: glukózu, fruktózu, mannózu, maltózu, sacharózu

dušičnany redukuje

sírovodík netvorí

indol netvorí

test na ureázu - pozitívny

test na katalázu - pozitívny

Voges-Proskauerov test - negatívny

k rastu vyžaduje z vitamínov - biotín a thiamín

z aminokyselín - homoserín

Nový kmeň indukovaný 18 h. posobením 0,05 M roztokom etylmetánsulfonátu na buncnú suspenziu východzieho kmeňa *Brevibacterium flavum* vo fosfátovom puffi (pH 7,2). Suspenzia po aplikácii - mutagénu - dvakrát premytá sterilnou destilovanou vodou - bola vyočkováaná na platne s minimálnym médiom, ktoré bolo doplnené okrem-biotínu a thiamínu tiež L-homoserínom (0,01 mg/ml) a S-(2-aminoetyl)-L-systeínom (10 mg/ml) a platne boli inkubované pri 28 °C 120 h. Kolónie, ktoré sa objavili na platniach boli vyočkované na šikmé mäsopeptónové agary. Kultúry, ktoré vyrástli na agaroch boli testované na dependenciu na homoserín, na stupeň rezistencie na anológo a na schopnosť produkovať do média L-lyzín.

Spôsob fermentačnej prípravy lyzinu použitím tohoto kmeňa je pre ilustráciu popísaný v nasledujúcom prípade.

Příklad 1

24 h. kultúrou kmeňa *Brevibacterium flavum* CCM 251 ktorá vyrástla na mäsepeptonovom šikmnom agare sa očkuje 500 ml varná baňka so 60 ml inokulačného média nasledovného zloženia: sacharóza 2,5 %, kukuričný výluh (65 % sušiny) 3 %, pH 7,0. Naočkovaná baňka sa inkubuje na rotačnej trepačke (220 obr./min. pri 28 °C 24 h. 50 ml inokula sa očkuje 800 ml produkčného média v dvojlitrovom fermentačnom tanku, Zloženie produkčného média: sacharóza 18 %, kyslý hydrolyzáta arašidovej múky 25 obj. %, kukuričný extrakt (65 % sušiny) 1 %, KH_2PO_4 0,2 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,003 %, CaCO_3 2 % a stopové množstvo $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (20 mg/1000 ml), $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (20 mg/1000 ml), biotínu (50 mcg/1000 ml), thiamínhydrochloridu (200 mcg/1000 ml) sójového oleja (3 ml/1000 ml), pH 7,0. Naočkované médium sa mieša 800 obr./min. a vzdušní 0,8 l vzduchu/min. pri teplote 29 °C. K odpeňovaniu sa počas kultivácie používa sójový olej. pH sa upravuje čpavkom v 6 h. intervaloch na 7,0 - 7,2. Počas kultivácie sa pridáva roztok sacharózy a to po 50 ml 70 %-ného roztoku v 30, 42, 52, 62, 72 h. kultivácie. Doba kultivácie 96 h. - Lyzín sa stanovuje manometricky s použitím dekarboxylázy lyzinu. Produkcia v 96 h. 96 g/l - L-lyzinu.

P R E D M E T V Ý N Á L E Z U

Kmeň mikroorganizmu *Brevibacterium flavum* CCM 251-dependentný na homosérin a rezistentný k S-(2-aminoetyl)-L-cysteínu, produkujúci L-lyzín.