



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

196052

(11) (B1)

/22/ Přihlášeno 24 09 77
/21/ /PV 6196-77/

(51) Int. Cl.³
C 12 N 1/20

(10) Zveřejněno 29 06 79

(45) Vydáno 15 05 82

(75)

Autor vynálezu

PLACHÝ JIŘÍ dr. CSc., ROZTOKY u Prahy a ULBERT STANISLAV ing., PRAHA

(54) Kmen mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum* CCM 3286

1

Vynález se týká kmene mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum* CCM 3 286, který je nový a který je charakterizován inhibicí při růstu v minimálním médiu již nízkými koncentracemi L-threoninu a schopností hromadit v médiu s vhodnými zdroji uhlíku, dusíku a minerálních solí, doplněném kultivační tekutinou po kultivaci producenta L-homoserinu, za aerobních podmínek, při neutrálním pH, v rozmezí teplot 27 až 32 °C vysoká množství L-lysinu.

Do roku 1970 byly nejčastěji používanými mikroorganismy při fermentační výrobě L-lysinu auxotrofní mutanty druhů *Corynebacterium* a *Brevibacterium*. Bylo však zjištěno, že vhodnými producenty L-lysinu mohou být i mutanty jiné než auxotrofní. Pracující se s výchozím kmenem *Brevibacterium flavum* ATCC 14 067 izolovali Sano a Shio /J. gen. appl. Microbiol. 17, 97, 1971/ mutanty citlivé na threonin, methionin a threonin + methionin, které v minimálním médiu byly inhibovány nízkými koncentracemi threoninu nebo methioninu. Inhibici růstu bylo možno potlačit přidáním methioninu nebo threoninu do média. Tyto mutanty hromadily v médiu relativně vysoká množství L-lysinu /30 g/l/.

Schopnost citlivých mutant hromadit vysoká množství L-lysinu není specifická jen pro druh *Brevibacterium flavum*, ale byla zaznamenána i u druhu *Brevibacterium lactofermentum*, jak o tom svědčí využití citlivých mutant obou těchto druhů při fermentační přípravě L-lysinu, popsané ve francouzském pat. spise č. 1 533 688, kde jsou uvedeny mutanty *B. flavum* a *B. lactofermentum*, citlivé na threonin nebo mutanty současně

2

na threonin citlivé i dependentní, produkující v médiu s cukrem v 72. až 120. hodině kultivace L-lysin v množství 10 až 35 g/l.

Produkci výše zmíněných dosud známých kmenů převyšuje kmen, který je předmětem tohoto vynálezu, a to nový kmen mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum*, uložený v Československé sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně v Brně, tř. Obránců míru 10, pod označením CCM 3 286.

Hlavní výhodou nového kmene je zvýšená produkce L-lysinu, přesahující 50 g/l, a to při trojstupňové kultivaci v produkčním médiu se sacharosou, hydrolyzátem arašídové mouky a minerálními solemi, doplněném kultivační tekutinou po kultivaci producenta L-homoserinu /kmen *Corynebacterium* sp. 9 366-EMS/329/, ve fermentačním tanku za vhodného míchání a vzdušnění, za udržování pH v rozmezí 6,8 až 7,2 čpavkem a při teplotě 29 °C. Další výhodou nového kmene je snížená spotřeba sacharosy během kultivace. Ve srovnání se standardním sbírkovým kmenem *Brevibacterium flavum* ATCC 21 127 je spotřeba sacharosy o 25 % nižší.

Nový kmen mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum* CCM 3 286 je charakterizován následujícími morfologicko-kultivačními a fyziologickými vlastnostmi.

Morfologicko-kultivační vlastnosti: gram-pozitivní, nepohyblivé a nesporulující kokky až krátké tyčinky o velikosti 1,6 x 1,9 až 3,5 um, s metachromatickými granuly, vyskytující se jednotlivě, v párech i v nepravidelných shlucích.

Na masopeptonovém agaru tvoří okrouhlé, hladké, lesklé, krémově bílé kolonie, s rov-

nými 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 mikroorganismus.

Želatinu neztékucuje.

Lakmusové mléko odbarvuje, ale nesráží.

Glukosu, fruktosu a sacharosu zkvašuje.

Škrob hydrolyzuje jen slabě.

Celulosu nerozkládá.

Dusičnany neredukuje.

Sirovodík netvoří.

Indol netvoří.

Test na katalázu: pozitivní.

Test na methylenovou modř: negativní.

Voges-Proskauerův test: negativní.

K růstu vyžaduje nový kmen biotin. Methionin jen růst stimuluje. Produkci L-lysinu stimuluje homoserin.

Nový kmen byl indukován z výchozího prototrofního kmene *Corynebacterium glutaminum*, a to 18hodinovým působením 0,05 M roztoku ethylmethansulfonátu ve fosfátovém pufru /pH 7,2/ na 24 hodin starou promytou buněčnou suspenzi výchozího kmene a vyočkováním promyté suspenze po aplikaci mutagenu na plotny s minimálním médiem s přidávkou a bez přidavku 500 µg L-threoninu/ml. Kolonie vyrostlé po 48 až 72 hodinách inkubace při 28 °C na plotnách bez threoninu, ne však na plotnách s threoninem, byly vyočkovány na šikmé masopeptonové agary a kultury vyrostlé na šikmých agarech, po ověření citlivosti na threonin, byly testovány na schopnost produkovat L-lysin.

Způsob fermentační výroby L-lysinu s použitím nového kmene je pro ilustraci popsán v následujícím příkladu provedení.

P ř í k l a d p r o v e d e n í

Kulturou kmene *Corynebacterium glutamicum* CCM 3 286, 24 hod. starou, vyrostlou na masopeptonovém šikmém agaru, se očkuje 60 ml inokulačního média v 750 ml Erlenmayerově baňce, jež má toto složení /v g/:

glukosa	20,0
kukuřičný výluh	
/65 % sušiny/	15,0
voda	1 000 ml

pH 7,0, sterilizace 30 min při 120 °C. Po zaočkování se inkubuje na reciproké třepačce /91 kyvů/min, délka kyvu 9 cm/ 24 hodin při 28 °C. Získaným inokulem se v množství 6,25 % obj. očkuje dvoulitrové fermentační tanky, plněné 800 ml média tohoto složení /v g/:

sacharosa	50,0
kukuřičný výluh	
/65 % sušiny/	15,0
voda	1 000 ml

pH 6,8 až 7,0; sterilizace při 122 kPa 3x po 30 min. Médium se míchá 750 až 780 obrátek/min a vzdušní 0,5 l/min/obj. média. Teplota 29 °C, délka kultivace 18 hod. Inokulem z očkovacího tanku v množství 6,25 % obj. se očkuje 800 ml produkčního média ve dvoulitrovém fermentačním tanku, jež má toto složení /v g/:

sacharosa	200,0
kyselý hydrolyzát	
arašídové mouky	165,0
prim. fosforečnan	
draselný	2,0
síran hořečnatý kryst.	0,5
uhličitan vápenatý	20,0
kultivační tekutina kmene	
<i>Corynebacterium</i> sp.	
9 366 EMS/329	120,0 ml
kyselina citrónová	5,0
biotin	1,0
L-methionin	20,0
voda	1 000 ml

pH 7,0, sterilizace při 122 kPa 3x po 30 minutách. Míchání 710 až 750 obr./min, vzdušnění 0,8 l/min/obj. média. Teplota 29 °C. Odpěňování během kultivace sojovým olejem. pH se upravuje v šestihodinových intervalech čpavkem na 7,0. Během kultivace se přidává 70% roztok sacharosy, a to po 50 ml v 18., 30. a 42. hodině kultivace. Délka kultivace 96 hod. Obsah L-lysinu se stanovuje manometricky s použitím dekarboxylázy lysinu. Produkce v 96. hodině je 53 g/l.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Kmen mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum* CCM 3 286, citlivý na L-threonin a

produkující L-lysin.