

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



URAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

250361
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 1/20

(22) Přihlášeno 21 06 85
(21) (PV 4581-85)

(40) Zveřejněno 18 09 86

(45) Vydáno 15 07 88

(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 *Corynebacterium glutamicum* CCM 3867

1

2

Řešení se týká kmene mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum* CCM 3867, dependentní na homoserin a resistantní k S-[2-aminoethyl]-L-cysteinu a chlorlysinu, produkující lysin.

Vynález se týká kmene mikroorganismu druhu *Corynebacterium glutamicum*, dependentního na homoserin a resistantního k analogům lysinu, který v médiu s vhodným zdrojem uhlíku a dusíku hromadil za aerobních podmínek a při neutrálním pH vysoká množství lysinu.

Vhodnými producenty lysinu jsou mutanty koryneformních bakterií, především mutanty rodů *Brevibacterium* a *Corynebacterium*. Z těchto mutant se osvědčily mutanty regulační a mutanty současně regulační a auxotrofní, selektované jako mutanty resistantní k analogům aminokyselin a zároveň dependentní na aminokyseliny. Významná množství lysinu hromadily v prostředí některé mutanty *Brevibacterium flavum* resistantní k analogu lysinu, tj. k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu (Sano, K.-Shiio, I.: JJ. Gen. Appl. Microbiol. 16, 373. 1970). Mutanty *Corynebacterium glutamicum*, vyznačující se kromě resistance k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu také dependencí na takové aminokyseliny jako je serin, prolin, leucin a alanin, hromadily v médiu 30 až 40 g/l lysinu (západoněmecký patent 2 321 461, 1973). Mutanta *Brevibacterium lactofermentum* současně resistantní k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu a k -amino-hydroxyvalerové kyselině hromadila v médiu 32 g/l lysinu (Tosaka, O. Takinami, K. Hirose, Y.: Agr. Biol. Chem. 42, 745, 1978).

Produkci lysinu převyšuje dosud známé zmíněné kmeny kmen *Corynebacterium glutamicum*, uložený v Československé sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně v Brně, třída Obránců míru 10, pod označením CCM 3867, který je předmětem vynálezu.

Autoři vynálezu se rovněž zabývali způsobem šlechtění mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum*, kterým se nový kmen získává. Podstata šlechtění spočívá v tom, že se na kulturu výchozího kmene mikroorganismu působí roztokem 0,05 M ethylmethansulfonátu po dobu 18 hodin, načež se izolují získané mutanty, vyrostlé po kultivaci v tekutém kompletním médiu, na minimálním tuhém médiu doplněném 0,001 mg/ml L-homoserinu a 1 mg/ml chlorlysinu. Chlorlysin, tj. 2,6-diamino-4-chlorhexanokarbonylová kyselina, je analog lysinu, který má vodíkový atom v poloze 4 nahrazen atomem chloru. S výhodou se používá 0,05 M roztoku ethylmethansulfonátu ve fosfátovém pufru (pH 7,2).

Hlavní výhodou nového kmene podle vynálezu je zvýšení produkce lysinu, podmíněné dependencí na homoserin a resistencí k dvěma analogům lysinu, tj. k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu a k chlorlysinu. Při kultivaci nového kmene v produkčním médiu se sacharózou a melasou nebo jen s melasou jako zdroji uhlíku, s kyselým hydrolyzátem arašídové mouky, kukuřičným výluhem a síranem amonným jako zdroji dusíku a s minerálními solemi v baňkách inkubovaných na rotační třepačce při 28 °C a pH udržova-

ném vodním roztokem čpavku na hodnotě 7,0 lze dosáhnout po 4-denní kultivaci produkce L-lysínu 52 g/l (v médiu se sacharózou a melasou) a 45 g/l (v médiu s melasou).

Nový kmen *Corynebacterium glutamicum* CCM 3867 je charakterizován následujícími morfologicko-kultivačními a fyziologickými vlastnostmi:

Grampozitivní, nepohyblivé, nesporulující kokky až krátké tyčinky, vyskytující se jednotlivě, v párech i v nepravidelných shlucích.

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

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

Při růstu v bujónu dochází k tvorbě zákalu a sedimentu, blanka se netvoří.

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

Fyziologické vlastnosti:

Optimální teplota: 28 až 30 °C.

Optimální pH: 7,0 až 7,2.

Aerobní organismus.

Želatinu neztékucuje.

Lakmusové mléko odbarvuje, ale nesráží.

Glukózu, fruktózu a sacharózu zkvašuje.

Škrob hydrolyzuje slabě.

Celulózu nerozkládá.

Dusičnany netvoří.

Sirovodík 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 postupuje tak, že se výchozí kmen *Corynebacterium glutamicum* CCM 3287, resistantní k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu a dependentní na homoserin, nechá submersně růst 24 hodin v kompletním médiu a buněčná suspenze se po promytí fosfátovým puforem s hodnotou pH 7,2 vystaví působení mutagenu, v tomto případě 0,05 M roztoku ethylmethansulfonátu ve fosfátovém pufru (pH 7,2). Po této operaci se promytou suspenzí očkuje baňka s kompletním médiem, která se inkubuje 24 hodin. Promytou suspenzí vhodně naředěnou se očkují plotny s minimálním médiem doplněným homoserinem a chlorlysinem. Mutanty resistantní k chlorlysinu se vyočkují na šikmé masopeptonové agary. Isoláty vyrostlé na agarech se po otestování stupně resistance k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu a k chlorlysinu a dependence na homoserin produkčně hodnotí v médiích se sacharózou a melasou nebo jen s melasou jako zdrojem uhlíku.

Podrobnosti vynálezu vyplývají z následujících příkladů provedení:

Příklad 1

Mikroorganismem *Corynebacterium glutamicum* CCM 3287 se očkuje 60 ml kompletního média v 500 ml varné baňce. Složení kompletního média 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 média

(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 2× promyje fosfátovým pufrům (pH 7,2) a po promytí se vystaví 18 hodinovému působení 0,05 M roztoku ethylmethansulfonátu ve fosfátovém pufru (pH 7,2). Po aplikaci mutagenu se suspenze 2× promyje sterilní destilovanou vodou a 5 % (obj.) suspenze se očkuje 500 ml varná baňka se 60 ml kompletního média, která se inkubuje 24 h při 28 °C na rotační třepačce. Buněčná suspenze se 2× promyje sterilní destilovanou vodou a vhodně naředěnou suspenzí se očkují plotny s minimálním médiem doplněným 0,001 mg/ml a 1 mg/ml chlorlysinu. Složení minimálního média je následující:

glukóza	0,1 %
citran sodný	0,04
KH_2PO_4	0,7
K_2HPO_4	0,2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
roztok biotinu	2 mg/1 000 ml
roztok solí	1 ml/1 000 ml
agar	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).

Mutanty resistantní k chlorlysinu se vyočkují na šikmé masopeptonové agary a izoláty vyrostlé na agarech se jednak testují na dependenci na homoserin a resistenci k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu a chlorlysinu, jednak se zjišťuje jejich schopnost produkovat lysin v produkčních médiích se sacharózou a melasou nebo jen s melasou jako zdrojem uhlíku.

Příklad 2

Kulturou kmene *Corynebacterium glutamicum* CCM 3867, 24 h starou, se očkuje 60 mililitrů inokulačního média CSL-B-S v 500 mililitrech varných baňkách. Složení inokulačního média 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°. 10 % (obj.) inokula se očkují 500 ml varné baňky s 20 mililitrech produkčního média BSM nebo BM-1 následujícího složení:

Médium BSM:

sacharóza	15,0 %
melasa	3,0
hydrolyzát arašídové mouky	22,0 % (obj.)
kukuřičný výluh	1,5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	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
biotin (technický)	0,00005
pH	7,0

Médium BM-1:

melasa	25,0 %
hydrolyzát arašídové mouky	18,0 % (obj.)
kukuřičný výluh	1,5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	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
biotin (technický)	0,00005
pH	7,0

Během 4denní kultivace se pH upravuje ve 24 hodinových 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 dekarboxylasy lysinu a cukr jako glukóza s použitím analyzátoru glukózy Glucose Analyzer 2 (Beckman, U.S.A.).

Produkce lysinu po 4 dnech kultivace v médiu BSM činila 52 g/l a v médiu BM-1 45 g/l.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Kmen mikroorganismu *Corynebacterium* moserin a resistantní k S-(2-aminoethyl)-L-glutamicum CCM 3867 dependentní na ho-
-cysteinu a chlorlysinu, produkující lysin.