



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

196053

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 1/20

/22/ Přihlášeno 24 09 77
/21/ /PV 6197-77/

(40) Zveřejněno 29 06 79

(45) Vydáno 15 05 82

(75)
Autor vynálezu

PLACHÝ JIŘÍ dr. CSc., ROZTOKY u Prahy, ČULÍK KAREL dr., ULBERT
STANISLAV ing., PRAHA, BUČKO MICHAL ing. CSc., BANSKÁ BYSTRICA,
CHROMÍK JINDŘICH ing., PRAHA, VANICKÝ MIROSLAV, ROZTOKY u Prahy,
HOFBAUER HENRICH ing., MIKLÁŠ EMIL ing., BANSKÁ BYSTRICA, SEVERA
ZDENĚK ing., PRAHA, HANO ALEXANDER ing., BANSKÁ BYSTRICA a SIKYTA
BOHUMIL dr. CSc., PRAHA

(54) Způsob šlechtění mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum* a kmen
mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum* CCM 3287

1

Vynález se týká způsobu šlechtění mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum* a kmen mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum* CCM 3 287, produkujícího L-lysin, rezistentního k analogu lysinu a dependentního na homoserin.

Do roku 1970 byly nejčastěji používanými mutanty při fermentační výrobě lysinu mutanty auxotrofní, především mutanty dependentní na homoserin. Sano a Shio /J. Gen. Appl. Microbiol. 16, 373, 1970/ popsali mutanty druhu *Brevibacterium flavum*, které v přítomnosti sirného analogu lysinu S-/2-aminoethyl/-L-cysteinu /AEC/ a threoninu rostly, zatímco výchozí prototrofní kmen byl inhibován. Tyto rezistentní mutanty /AEC^r-mutanty/ hromadily v médiu lysin v množství okolo 32 g/l.

Schopnost rezistentních mutant hromadit vysoká množství lysinu není specifická jen pro výše uvedený druh, ale byla zaznamenána i u dalších druhů známých jako potenciální producenti lysinu. V případě tohoto druhu je rezistence k S-/2-aminoethyl/-L-cysteinu většinou kombinována ještě s auxotrofií. Z kmenů s touto charakteristikou lze jmenovat například *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21 526 /AEC^r, Homoser⁻, Leu⁻, produkce 32,5 g/litr/, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21 543 /AEC^r, Homoser⁻, Leu⁻, produkce 32,0 g/l/ a kmeny uvedené v NSR pat. spise č. 2 321 461, vyznačující se kromě rezistence k AEC také dependencí na aminokyseliny /serin, prolin, leucin, alanin/, vitaminy /vitamin B₁₂/ a komponenty nukleových kyselin /guanin/, které hromadí v médiu 30 až 40 g/l lysinu.

2

Pro ekonomickou průmyslovou fermentační výrobu lysinu jsou ovšem uvedené množství nízká. Byla proto hledána možnost, jak získat kmen, popřípadě mutantu, s maximální produkcí lysinu v přijatelné době, bez mimořádných nároků na základní složky média a jejich množství.

Produkcí lysinu převyšuje dosud známé zmíněné kmeny nový kmen *Corynebacterium glutamicum*, uložený v československé sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně v Brně, třída Obránců míru 10, pod označením CCM 3 287, který je předmětem vynálezu.

Předmětem vynálezu je rovněž způsob šlechtění mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum*, kterým se nový kmen získává a jehož podstata spočívá v tom, že se na kulturu výchozího prototrofního mikroorganismu působí roztokem 0,05 M ethylmethansulfonátu po dobu 18 hodin; načež se izolují získané mutanty, vyrostlé po vyočkování suspenze po působení mutagenu, na minimálním médiu s přísadou 10 mg/ml S-/2-aminoethyl/-L-cysteinu a 0,001 mg/ml L-homoserinu. S výhodou se používá 0,05 M roztoku ethylmethansulfonátu ve fosfátovém pufru s hodnotou pH 7,2.

Hlavní výhodou nového kmene podle vynálezu je podstatně zvýšená produkce lysinu, podmíněná jednak rezistencí na analog lysinu, jednak dependencí na homoserin. Zvýšená produkce je patrná při dvoustupňové kultivaci tohoto kmene v produkčním médiu se sacharosou, kyselým hydrolyzátem arašídové mouky, kukuřičným výluhem a minerálními solemi ve fermentačním tanku, při vhodném míchání a vzdušnění, při stálém udržo-

vání pH v rozmezí 6,8 až 7,2 pomocí čpavku a za teploty 29 °C. Za uvedených podmínek se po 96 hodinách kultivace dosáhne produkce lysinu kolem 60 g/l média.

Nový kmen *Corynebacterium glutamicum* CCM 3 287 je charakterizován následujícími morfologicko-kultivačními a fyziologickými vlastnostmi: Grampozitivní, nepohyblivé s nesporeujícími kokky až krátké tyčinky, velikosti 1,6 x 1,9 až 3,5 µm, s metachromatickými granuly, vyskytující se jednotlivě, v párech i v 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 tohoto organismu 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.

Zelatinu neztékucuje.

Lakmusové mléko odbarvuje, ale nesráží.

Glukosu, fruktosu a sacharosu zkvašuje.

Škrob hydrolyzuje jen slabě.

Celulosu nerozkládá.

Dusičnany neredukuje.

Sírovodík netvoří.

Indol netvoří.

Test na katalázu: pozitivní.

Test na methylenovou modř: negativní.

Voges-Proskauerův test: negativní.

K růstu vyžaduje z vitamínů biotin a z aminokyselin homoserin.

Při způsobu šlechtění podle vynálezu se zpravidla postupuje tak, že se výchozí prototrofní mikroorganismus *Corynebacterium glutamicum* nejprve kultivuje 24 hodin v kompletním médiu, potom se buněčná suspenze promyje fosfátovým pufrem s hodnotou pH 7,2 a vystaví působení mutagenu, v tomto případě 0,05 M roztoku ethylmethansulfonátu, nejlépe opět v pufru s hodnotou pH 7,2. Po této operaci se suspenze promytá destilovanou vodou kultivuje na minimálním médiu s přísadou S-/2-aminoethyl-/L-cysteinu a L-homoserinu. Kolonie, které vyrostou, se vyočkují na šikmé masopeptonové agary a testují na stupeň rezistence na analog, na dependenci na homoserin a na schopnost produkovat lysin.

Podrobnosti vynálezu vyplývají z následujících příkladů provedení.

P ř í k l a d 1

Prototrofním mikroorganismem *Corynebacterium glutamicum* se naočkuje 60 ml média v 750 ml Erlenmayerově baňce, tohoto složení /v g/:

glukosa	0,5
hydrolyzát kaseinu	10,0
výluh z droždí	5,0
prim. fosforečnan draselný	3,0
sek. fosforečnan draselný	1,0
roztok solí	1 ml
řasový agar	25,0
voda	1 000 ml

/roztok solí je roztok 0,5 g heptahydrátu síranu železnatého ve 100 ml vody/.

Inkubuje se na reciproké třepačce /počet kyvů 91/min, délka kyvu 9 cm/ při 28 °C 24 hodin. Buněčná suspenze se potom promyje fosfátovým pufrem /pH 7,2/ a po promytí se vystaví 18 hodin působení 0,05 M ethylmethansulfonátu. Potom se buněčná suspenze promyje 2x sterilní destilovanou vodou, zředí a zředěnou suspenzí se očkují plotny s tímto médiem /v g/:

glukosa	1,0
citronan sodný	0,4
prim. fosforečnan draselný	7,0
sek. fosforečnan draselný	2,0
síran amonný	1,0
síran hořečnatý kryst.	0,1
roztok solí /jako výše/	1 ml
roztok 0,02 g biotinu ve 100 ml destil. vody	0,02 g
agar	25,0
destilovaná voda	1 000 ml

Médium se doplní 10 mg/ml S-/2-aminoethyl-/L-cysteinu a 0,001 mg/ml L-homoserinu. Plotny se inkubují při 28 °C 120 hodin a kolonie, které se po této době objeví na povrchu ploten, se vyočkují na šikmé masopeptonové agary. Izoláty vyrostlé na agarrech se testují na stupeň rezistence na analog, dependenci na homoserin a schopnost produkovat lysin.

P ř í k l a d 2

Kulturou kmene *Corynebacterium glutamicum* CCM 3 287, 24 hodin starou, se očkuje 60 ml inokulačního média v 750 ml Erlenmayerově baňce tohoto složení /v g/:

sacharosa	25,0
kukuřičný výluh /65 % sušiny/	30,0
voda	1 000 ml

pH 7,0; sterilizace při 120 °C 30 min. Zaočkovávaná půda se inkubuje na reciproké třepačce /91 kyvů/min, délka kyvu 9 cm/ při 28 °C 18 až 24 hodin. Narostlou kulturou v množství 50 ml se očkuje 800 ml produkčního média ve dvoulitrovém fermentačním tanku, tohoto složení /v g/:

sacharosa	180,0
kyselý hydrolyzát arašidové mouky	300,0 ml
kukuřičný výluh /65 % sušiny/	10,0
primární fosforečnan draselný	2,0
síran hořečnatý kryst.	0,3
uhličitán vápenatý	20,0
síran železnatý kryst.	0,02
síran manganatý kryst.	0,02
biotin	0,004
sójový olej	3 ml
voda	1 000 ml
pH	7,0

Sterilizace 3x po 30 min při 121,5 kPa. Vzdušnění 0,8 l/min, míchání 800 obr./min, teplota 29 °C. Odpěňování během kultivace sójovým olejem. pH se upravuje v šestihodinových intervalech čpavkovou vodou na 7,0. Během kultivace se přidává roztok sacharosy, a to 50 ml 70% roztoku ve 30., 42., 54., 66. a 74. hodině kultivace. Doba kultivace 96 hodin. Obsah lysinu se stanovuje manometricky s použitím dekarboxylázy lysinu. Produkce lysinu po 96 hodinách kultivace je 61,5 gramů/l.

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

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 přísadou 10 mg/ml S-/2-aminoethyl/-L-cysteinu a 0,001 mg/ml L-homoserinu.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se působí 0,05 M roztokem ethylmethansulfonátu ve fosfátovém pufru s hodnotou pH 7,2.

3. Kmen mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum* CCM 3287, produkující lysin, rezistentní k analogu lysinu a dependentní na homoserin, získaný způsobem podle bodu 1.