



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

206946

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 13 09 79
(21) (PV 6192-79)

(40) Zveřejněno 15 09 80

(45) Vydáno 01 07 84

(51) Int. Cl.³
C 12 P 13/08
C 12 R 1/13

(75)

Autor vynálezu

PALEČKOVÁ FRANTIŠKA RNDr., ČULÍK KAREL RNDr. a
PILÁT PETR ing. CSc., PRAHA

(54) Kmen *Brevibacterium* sp. AO 6/79

Vynález se týká kmene *Brevibacterium* sp. AO 6/79, produkujícího L-lysin při kultivaci na tekutých živných půdách, obsahujících zdroje uhlíku, například sacharózu nebo melasu, zdroje dusíku, například kukuřičnou máčecí vodu, hydrolyzát arašídové nebo sojové mouky a minerální živné sole, a to za podmínek jednorázové a zvláště pak kontinuální kultivace.

Kmen *Brevibacterium* sp. AO 6/79 byl připraven šlechtěním zaměřeným na přípravu mutant, které se fenotypově neliší od divokého kmene, ale které se liší od kmene výchozího nároky na výživu. Výchozí kmen *Brevibacterium* sp. CB (sbírkové označení Výzkumného ústavu antibiotik a bio-transformací v Roztokách u Prahy) je dependentní na homoserin a rezistentní k analogu lysinu (S-B-aminoethyl)-cysteinu (hom^- , AEC^r). Při získávání výše uvedeného kmene byla práce zaměřena na znak homoserin. Znak AEC^r zůstal nezměněn. Výsledkem byl kmen *Brevibacterium* sp. AO 6/79, fenotypově hom^- , geneticky mutace supresorového typu, kromě jiného při srovnání s výchozím kmenem s nezměněnou produkční schopností. Kmen byl izolován z mutagenního pokusu, v němž bylo jako mutagenu použito nitrosomethylmočoviny v koncentraci 0,1 M po dobu 60 minut. Roztok mutageny i suspenze buněk byly připraveny v citráto-fosfátovém pufru s hodnotou pH 6,0. Po pokuse

byla kontrolní i pokusná suspenze vysívána na Petriho misky (průměr 100 mm) s kompletní agarovou půdou, aby byl zjištěn podíl přežívajících buněk. Pokusná suspenze byla zároveň očkovaná do tekuté kompletní půdy a kultivována na třepačce (240 obr./min., výchylka 25 mm) při 28 °C po dobu 48 hodin ve 100 ml Erlenmayerových baňkách s obsahem 20 ml půdy, očkované 1 ml pokusné suspenze. Po skončení kultivace byla suspenze vysívána na Petriho misky s minimální agarovou půdou obsahující glukózu a cirkát sodný, síran amonný a stopové prvky. U vyrostlých kolonií byla testována produkce lysinu jednoduchým testem, ve kterém byla sledována podle růstových zón indikátorového kmene *Escherichia coli* dependentního na lysin (lys^-) kolem válečků agarové půdy s kulturou testovaných izolátů na vrcholu. Kmen *Brevibacterium* sp. AO 6/79 byl izolován tímto způsobem. Jeho produkce byla ověřena kultivačním testem na třepačce a v laboratorních tancích na kompletní půdě a bylo zjištěno, že se shoduje s produkcí výchozího kmene *Brevibacterium* sp. CB.

Kmen *Brevibacterium* sp. AO 6/79 se od výchozího kmene morfologicky neliší, je však odlišný svými fyziologickými vlastnostmi, které jsou projevem genetické změny. Jedná se o nutriční požadavky, kinetiku růstu a produkční vlastnosti.

Na rozdíl od kmene *Brevibacterium* sp. CB je kmen AO 6/79 schopen růst na minimální půdě a rozdíl v požadavku, respektive stimulaci růstu homoserinem je také výrazný. Za standardních podmínek (optimální hladina homoserinu, výchozí koncentrace buněk kultury atd.) byla u kmene CB naměřena nejvyšší specifická růstová rychlost 0,48 hodin⁻¹, v případě kmene podle vynálezu 0,27 hodin⁻¹. Při snížení obsahu homoserinu v půdě na 1/10 optimální hladiny poklesla specifická rychlost růstu kmene CB na 38 % výchozího stavu, u kmene podle vynálezu bylo snížení růstové rychlosti výrazně nižší (75 % standardní hodnoty). Rozdílné enzymatické vybavení obou kmenů je také doložitelné kinetikou růstu. Saturační konstanta růstu na sacharóze činí u kmene CB 105 mg/litr, kdežto u kmene podle vynálezu 259 mg/litr sacharózy.

Při testování produkčních schopností za standardních podmínek nebyly na úrovni baňkových kultur nalezeny výrazné rozdíly (kmen CB 31,1 g lysinu/litr, s koeficientem konverze sacharózy na lysin 0,174, kmen podle vynálezu 30,5 g lysinu/litr, s koeficientem 0,170). Podobných výsledků bylo dosaženo ve dvoulitrových fermentorech (kmen CB 71,3 g/litr a 0,214, kmen podle vynálezu 78,1 g/litr a 0,22). Na úrovni dvacetilitrových fermentorů, opět za standardních podmínek, však kmen CB akumuloval 65 g lysinu/litr, s koeficientem konverze 0,22, kdežto u kmene podle vynálezu byla produkce 60 g/litr s koeficientem konverze 0,26.

Kmen *Brevibacterium* sp. AO 6/79 byl vypěstován jak pro jednorázový tak hlavně pro kontinuální proces biosyntézy lysinu. Auxotrofní kmeny jsou ve větší či menší míře nestabilní a proto mutanty supresorového typu jsou se svou fyziologickou i produkční stabilitou podloženy geneticky jedním z mála řešení přípravy stabilního kmene pro kontinuální kultivace.

Nový kmen *Brevibacterium* sp. byl uložen ve sbírce typových kultur při IHE, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10, pod číslem AO 6/79.

Bližší podrobnosti jsou patrné z příkladů provedení.

Příklady provedení

Příklad 1

Kulturou kmene *Brevibacterium* sp. AO 6/79, vyrostlou na šikmém agaru kompletní půdy (J. Lederberg, Methods in Med. Res. 3,5–22, 1950), se v množství jedné kličky buněk očkuje 60 ml inokulační půdy v 500 ml varných baňkách. Půda má toto složení (v % hmot.):

sacharóza	2,5
kukuřičná máčecí voda	3,0
vodovodní voda	do 100,0

pH před sterilizací 7,0, po sterilizaci 30 minut při 120 °C 6,8 až 7,0. Kultivace na rotační třepačce (240 obr./min., výchylka 25 mm) při 28 °C trvala 24 hodin.

Získaným vegetativním inokulem se v množství 10 % obj. očkuje 20 ml produkční půdy v 500 ml

varných baňkách, tohoto složení (v % hmot.):

sacharóza	18,0
kukuřičná máčecí voda	1,0
fosforečnan draselný primární	0,1
síran hořečnatý kryst.	0,015
uhličitán vápenatý	3,0
kyselý hydrolyzát arašidové mouky	25,0
síran amonný	1,0
vodovodní voda	do 100,0

Sterilizace 30 minut při 120 °C; pH upravené 25%ním roztokem čpavku na 7,8 až 8,0 se po sterilizaci pohybovalo v rozmezí 6,7 až 7,0. Na rotační třepačce trvala kultivace při 28 °C 48 až 96 hodin. Průměrná produkce lysinu v 96. hodině byla 30,5 g/litr.

Příklad 2

Vegetativním inokulem připraveným jako v příkladu 1 se v množství 7,5 % obj. zaočkuje 800 ml produkční půdy, stejného složení jako v příkladu 1, umístěné v laboratorních tancích objemu 2 litry. Sterilizace při 120 °C po dobu 30 minut. Míchání 770 obr./min., vzdušnění 0,8 litru/min. Průměrná produkce lysinu v 72. hodině fermentace byla 78 g/litr. Podle spotřeby a průběhu fermentace byla během kultivace přidávána sacharóza.

Příklad 3

Kultivace v laboratorních fermentorech o objemu 20 litrů (pracovní objem 10 litrů) probíhala ve třech stupních: baňkové inokulum – inokulační fermentor – produkční fermentor. Inokulum v baňkách bylo připraveno jako v příkladu 1. Inokulační fermentor byl plněn půdou tohoto složení (v % hmot.):

sacharóza	2,5
kukuřičná máčecí voda	3,0
technický biotin (1 %ní)	0,0006
thiamin	0,00002
sojový olej	0,3
vodovodní voda	do 100,0

pH bylo upraveno na hodnotu 6,8 až 7,0, sterilizace při 122 °C po dobu 60 minut. Fermentor byl naočkován 2 % obj. baňkového inokula, propagace probíhala 14 hodin, za míchání 350 obr./min. a vzdušnění 10 litrů/min., při teplotě 28 °C.

Třetí stupeň, tj. vlastní produkční proces, probíhal v půdě tohoto složení (v % hmot.):

sacharóza	18,0
kukuřičná máčecí voda	1,0
hydrolyzát arašidové mouky	25,0 % obj.
fosforečnan draselný primární	0,2
síran hořečnatý kryst.	0,03
technický biotin (1 %ní)	0,0005
thiamin	0,00002
polypropylenglykol	0,02 % obj.
vodovodní voda	do 10 litrů

Hodnota pH byla upravena a v průběhu fermentace udržována na 6,8 až 7,0. Jako inokulum sloužilo 10 % obj. narostlé kultury z druhého stupně. Podle spotřeby, průběhu kultivace a hodnoty pH byla ze zásobního roztoku přidávána další sacharóza. Kul-

tivační podmínky: míchání 470 obr./min., vzdušnění 10 litrů/min., teplota 28 °C. Podle použitých podmínek a kvality produkčního mikroorganismu

bylo dosahováno v 72. hodině produkce 63 až 65 g lysinu/litr, s koeficientem konverze sacharózy na lysin 0,29 až 0,32.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Kmen *Brevibacterium* sp. AO 6/79 produkující L-lysin.