



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

246669

(11)

(51)

(22) Přihlášeno 30 04 85
(21) PV 3172-85

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 1/20

(40) Zveřejněno 13 03 86

(45) vydáno 15 10 87

(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 3866

Účelem řešení se produkce esenciální aminokyseliny lysinu v mediu se sacharózou nebo melasou jako zdrojem uhlíku. Lysin syntetizuje a v mediu hromadí mutanta bakteriálního druhu *Corynebacterium glutamicum*. Působením mutagenu a aplikací selektivních medií byla izolována mutanta rezistentní k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu, dependentní na homoserin a citlivá na 2-fluorpyruvát, která kultivována 4 dny v mediu se sacharózou nebo melasou jako zdrojem uhlíku, hydrolyzátem arašídové mouky, kukuřičným výluhem a síranem amonným jako zdroji dusíku a s minerálními solemi hromadila při vysoké konverzi za aerobních podmínek při 28 °C a neutrálním pH v prostředí 57 g/l L-lysínu. Lysin, využívaný především jako doplněk krmiv, lze takto vyrábět s využitím mikroorganismů běžnými technologickými postupy.

Vynález se týká nového kmene mikroorganismu druhu *Corynebacterium glutamicum*, rezistentního k analogu lysinu, dependentního na homoserin a citlivého na 2-fluorpyruvát, který v médiu s vhodným zdrojem uhlíku a dusíku hromadil při vysoké konverzi uhlíkatého zdroje za aerobních podmínek a při neutrálním pH vysoká množství lysinu.

Jako producenti lysinu, vhodní pro jeho výrobu fermentační cestou, se osvědčily mutanty koryneformních bakterií, které kromě dependence na aminokyseliny byly současně rezistentní k analogům aminokyselin.

Když však bylo zjištěno (Tosaka, O.-Morioka, H.-Takinami, K.: Abstracts of Papers, General Meeting of Agric. Biol. Chem. Soc. Japan, 1978, p. 176), že mutanty citlivé k 2-fluorpyruvátu produkují relativně vysoká množství lysinu, byla ověřována možnost izolace mutantů rodů *Brevibacterium* a *Corynebacterium*, které by kromě genetických znaků, charakteristických pro produkci lysinu, tj. rezistence k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu a dependence na homoserin, vykazovaly také citlivost k 2-fluorpyruvátu (US pat. 4 275 157, 157, 1981).

Tak byla izolována např. mutanta *Corynebacterium acetoglutamicum*, rezistentní k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu, dependentní na homoserin a alanin, citlivá na 2-fluorpyruvát a produkující v médiu s glukózou 39 g/l L-lysínu při konverzi 39 %. S mutantou *Brevibacterium flavum* rezistentní k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu a citlivou na 2-fluorpyruvát bylo v médiu, kde zdrojem uhlíku byla opět glukóza, dosaženo produkce až 51 g/l L-lysínu (Ozaki, H.-Shiio, I.: Agr. Biol. Chem. 47: 1569, 1983).

Produkci lysinu převyšuje dosud známé zmíněné kmeny kmen *Corynebacterium glutamicum*, uložený v Československé sbírce mikroorganismů Univerzity J. E. Purkyně v Brně, třída Obránců míru 10, pod označením CCM 3 866, který je předmětem vynálezu.

Hlavní výhodou nového kmene podle vynálezu je jeho schopnost produkovat vysoká množství lysinu s vysokou účinností konverze uhlíkatého zdroje. Při kultivaci nového kmene v produkčním médiu se sacharosou nebo 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 udržovaném vodným roztokem čpavku na pH 7,0 lze dosáhnout po 4denní kultivaci produkce lysinu 50 g/l (s melasou) a 57 g/l (s sacharózou) při konverzi 30 a 35 %.

Nový kmen *Corynebacterium glutamicum* CCM 3 866 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 šikmém 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, nehemolyzující.

Fyziologické vlastnosti:

Optimální teplota: 27 až 32 °C.

Optimální pH: 7,0 až 7,2.

Aerobní organismus.

Želatinu neztékucuje.

Lakmusové mléko odbarvuje, ale nesráží.

Glukózu, fruktózu a sacharózu zkvašuje.

Škrob hydrolyzuje jen slabě.

Celulózu nerozkládá.
 Dusičnany neredukuje.
 Sirovodík 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.

Výchozí kmen *Corynebacterium glutamicum* CCM 3 287, rezistentní k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu a dependentní na homoserin, se submersně kultivuje 24 h v kompletním mediu a buněčná suspenze se po promytí fosfátovým pufrem (pH 7,2) vystaví 18hodinovému působení 0,05M roztoku ethylmethansulfonátu ve fosfátovém pufru (pH 7,2).

Buněčná suspenze se po aplikaci mutagenu promyje sterilní destilovanou vodou a 5 % (obj.) promyté suspenze se očkuje baňka s kompletním mediem, která se inkubuje 24 h. Promytou suspenzi vhodně naředěnou se očkují plotny s minimálním mediem doplněným homoserinem. Kolonie vyrostlé na plotnách se sterilními razídky přenesou na plotny s minimálním mediem doplněným homoserinem a plotny s minimálním mediem s homoserinem a 2-fluorpyruvát.

Mutanty citlivé na fluorpyruvát se vyočkují na šikmé masopeptonové agary. Isoláty vyrostlé na šikmých agarech se po otestování stupně rezistence k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu, dependence na homoserin a citlivosti na 2-fluorpyruvát produkčně hodnotí v produkčním mediu se sacharózou nebo melasou.

Podrobnosti vynálezu vyplývají z následujících příkladů provedení:

P ř í k l a d 1

Mikroorganismem *Corynebacterium glutamicum* CCM 3 287 se očkuje 60 ml kompletního media v 500ml varné baňce. Složení kompletního media 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 media

(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 2x promyje fosfátovým pufrem (pH 7,2) a po promytí se vystaví 18hodinovému působení 0,05M roztoku ethylmethansulfonátu ve fosfátovém pufru (pH 7,2).

Po aplikaci mutagenu se suspenze 2x promyje sterilní destilovanou vodou a 5 % (obj.) suspenze se očkuje 500ml varná baňka se 60 ml kompletního media, která se inkubuje 24 h při 28 °C na rotační třepačce. Buněčná suspenze se 2x promyje sterilní destilovanou vodou a vhodně naředěnou suspenzí se očkují plotny s minimálním médiem doplněné 0,001 mg/ml L-homoserinu. Složení minimálního media je následující:

glukóza	0,1 %
citrán 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.)

Kolonie, vyrostlé na plotnách po 2-3 dnech inkubace při 28 °C, byly sterilními razídky přeneseny na plotny s minimálním médiem, doplněné jednak homoserinem a jednak homoserinem a 10 µg/ml 2-fluorpyruvátu sodného. Mutanty citlivé na fluorpyruvát se vyočkují na šikmé maso-peptonové agary a izoláty vyrostlé na agarech se jednak testují na stupeň rezistence k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu, na dependenci na homoserin a citlivost na 2-fluorpyruvát, jednak se zjišťuje jejich schopnost produkovat lysin v produkčních médiích se sacharózou nebo melasou jako zdroji uhlíku.

P ř í k l a d 2

Kulturou kmene *Corynebacterium glutamicum* CCM 3 866, 24 h starou, se očkuje 60 ml inokulačního media CSL-B-S v 500ml varných baňkách. Složení inokulačního media 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 °C. 10 % (obj.) inokula se očkují 500ml varné baňky s 20 ml produkčního media BS nebo BM následujícího složení:

Medium BS: sacharóza	15,0 %
hydrolyzát arašídové mouky	20,0 % (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
Medium BM: melasa	30,0 %
hydrolyzát arašídové mouky	15,0 % (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 24hodinových 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 dekarboxylázy lysinu a cukr jako glukóza s použitím analyzátoru glukózy Glucose Analyzer 2 (Beckman, U.S.A.).

Produkce lysinu po 4 dnech kultivace v mediu BS je 57 g/l (konverze - 35 %) a v mediu BM 50 g/l (konverze - 30 %).

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Kmen mikroorganismu *Corynebacterium glutamicum* CCM 3 866, rezistentní k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu, dependentní na homoserin a citlivý na 2-fluorpyruvát, produkující při vysoké konverzi lysin.