



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

210520

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 1/20

(22) Přihlášeno 21 04 80
(21) (PV 2791-80)

(40) Zveřejněno 29 05 81

(45) Vydáno 15 07 83

(75)
Autor vynálezu

PLHÁČKOVÁ KAMILA dr., VOJTÍŠEK VLADIMÍR dr. CSc.,
ČULÍK KAREL dr., PRAHA, KOCUR MILOSLAV doc. dr. CSc., BRNO,
PLACHÝ JIŘÍ dr. CSc., ROZTOKY u Prahy

(54) Kmen mikroorganismu *Pseudomonas* sp. CCM 3443 s racemázovou aktivitou D,L-alfa-amino-epsilon-kaprolaktamu pro výrobu L-lysinu

1

Vynález se týká kmene mikroorganismu *Pseudomonas* sp. CCM 3 443 a jeho využití pro enzymovou výrobu L-lysinu racemizací D-alfa-amino-epsilon-kaprolaktamu.

Proces přípravy L-lysinu z D,L-alfa-amino-epsilon-kaprolaktamu (dále jen D,L-AKL) byl vyvinut na základě izolace a využití kvasinek z rodů *Candida*, *Cryptococcus* a *Trichosporon*, hydrolyzujících L-alfa-amino-epsilon-kaprolaktam (dále jen L-AKL) na L-lysin, a bakterií z rodů *Achromobacter*, *Alcaligenes* a *Flavobacterium*, racemizujících D-alfa-amino-epsilon-kaprolaktam (dále jen D-AKL) na jeho L-izomer, který je enzymově hydrolyzovatelný za vzniku L-lysinu, což je dokumentováno v japonských patentových spisech č. 7 415 795, 7 425 190, 7 462 589, 7 328 679, britských patentových spisech č. 1 334 970 a 1 352 860, v SRN patentovém spise č. 2 157 171 a franc. patentovém spise č. 2 114 862.

Kmeny použité pro proces racemizace byly taxonomicky identifikovány jako *Achromobacter cycloclastes* FERM-P 772, FERM-P 780 a IAM 1 013, *Achromobacter obae* sp. FERM-P 776, *Flavobacterium arborescens* FERM-P 177 a *Alcaligenes faecalis* FERM-P 778; citované rody a kmeny jsou předmětem patentové ochrany v uvedených patentových spisech.

Předmětný vynález se týká nového kmene, který byl izolován z přírody (z ornice) a systematicky (taxonomicky) nepatří mezi uvedené rody mikroorganismů, které jsou předmětem patentové ochrany v uvedených patentových spisech; navíc tento nový izolát, identifikovaný jako *Pseudomonas* sp. a podrobený mutagenезi, vykazuje podstatně výhodnější vlastnosti při využití pro enzymovou přípravu L-lysinu z D,L-AKL, spočívající zejména ve zvýšené produkci buněčné hmoty a vyšší rychlosti a úplnosti konverze.

Kmen byl získán na základě rozsáhlého screeningu z přírody izolovaných mikrobiálních

kmenů schopných růstu na D,L-AKL jako jediném zdroji uhlíku a dusíku a podroben selekci v médiu obsahující L-lysin, který sloužil jako hlavní zdroj uhlíku a dusíku. Získaný kmen byl dále podroben mutagenезi a izolát s nejrychlejším růstem v médiu obsahujícím L-lysin, vykazoval nejvyšší aktivitu D,L-AKL-racemázy a intenzivní růst se zvýšenou produkcí buněčné hmoty v médiích obsahujících D,L-AKL jako induktor syntézy racemázy.

V následujícím schématu jsou uvedeny charakteristiky mutantního kmene *Pseudomonas* sp. CCM 3 443.

A. Morfologie:

- | | |
|-------------------------------------|--|
| 1. Velikost (μ m), tvar buněk: | tyčinky, 0,6-0,9krát, 1,0-1,6 jednotlivé, často v párech, event. ve shlucích |
| 2. Pohyblivost: | pohyblivé, polární bičíky |
| 3. Gram - barvení: | negativní |

B. Pozorování kultur:

- | | |
|---|---|
| 1. Kolonie na masopeptonovém agaru: | |
| a) tvar: | celistvé, kulatě vypouklé, hladké |
| b) kvalita: | mukózní, s lesklým povrchem |
| c) barva: | bez pigmentu, neprůhledné, šedobílé |
| 2. Šikmá kultura na masopeptonovém agaru: | |
| a) růst: | střední |
| b) kvalita: | plný, hladký, značně mukózní |
| c) barva: | bělavě šedá, neprůhledná, lesknoucí |
| 3. Masopepton-agar vpich: | povrchový růst |
| 4. Želatina - vpich: | povrchový růst bez ztekucení |
| 5. Tekutý bujón: | povrchový růst v blance, bez zákalu a sedimentu |
| 6. Tekutý bujón s 0,1% KNO_3 : | silná turbidita, později sediment |
| 7. Brambory: | vlnký růst bez tmavnutí |

C. Růstové podmínky:

dobrý růst při 30 °C,
žádný růst při 37 °C,
dobrý růst při pH 6,5-7,2
obligátně aerobní vyjma
v přítomnosti nitrátů

D. Fyziologické charakteristiky:

- | | |
|----------------------------------|-----------------|
| 1. Tvorba indolu: | negativní |
| 2. Tvorba H_2S : | negativní |
| 3. Acetylmetylkarbinol: | neprodukován |
| 4. Redukce nitrátů: | pozitivní |
| 5. Denitrifikace: | silně pozitivní |
| 6. Kataláza: | pozitivní |
| 7. Ureáza: | pozitivní |
| 8. Oxidáza: | pozitivní |
| 9. Argininhydroláza: | negativní |
| 10. Želatina: | neztekucována |

11. Škrob:	nehydrolyzován
12. Ox-Ferm-test:	žádné změny a žádný růst za anaerobních podmínek
13. Utilizace C-zdrojů:	glycerol a acetát utilizován etanol, propionát, citrát neutilizován
14. Fermentace cukrů:	glukóza, sacharóza, laktóza, rafinóza, mannit bez kyselin a plynů
15. Citlivost na antibiotika:	penicilin a streptomycin resistentní, tetracyklin senzitivní
16. Utilizace D a L-aminokyseliny:	utilizován jako jediný zdroj uhlíku a dusíku
E. Zdroj:	izolován z ornice

Popsaný kmen produkuje racemázu D,L-AKL, prokázanou úbytkem optické otáčivosti roztoku L-AKL, a ve směsi s producentem L-AKL hydrolázy umožňuje 100% konverze D,L-AKL na L-lysin.

Výsledek je tedy vyznačen mutantním kmenem mikroorganismu *Pseudomonas* sp. CCM 3 443, využitelným pro enzymovou výrobu L-lysinu a syntetizujícím specifickou racemázu D,L-alfa-amino-epsilon-kaprolaktamu.

Aktivita D,L-AKL-racemázy byla zjišťována změnou optické otáčivosti 5% (hmota/objem) vodného roztoku L-AKL-HCL upraveného zředěným roztokem KOH na hodnotu pH 8,0 po třicetiminutové inkubaci buněčné suspenze *Pseudomonas* sp. při 37 °C. Aktivita L-AKL hydrolázy byla zjišťována z přírůstků koncentrací L-lysinu po desetiminutové inkubaci buněčné suspenze *Cryptococcus* sp. VÚAB 440 v 2,5% (hmota/objem) vodném roztoku L-AKL-HCL, jehož pH bylo upraveno zředěným roztokem KOH na hodnotu pH 7,5 při 37 °C. Účinnost enzymové konverze různě koncentrovaných vodných roztoků D,L-AKL, které obsahovaly nativní buňky nebo acetodem ošetřené buňky obou zmíněných producentů byla měřena chromatografií na tenké vrstvě s densitometrickým vyhodnocením přírůstků koncentrací L-lysinu a úbytku D,L-AKL a manometricky pomocí surového enzymového preparátu L-lysin-dekarboxylázy připraveného z *Mycobacterium* sp.

Enzymové a další výhodné vlastnosti předmětného kmene a postup výroby L-lysinu pomocí tohoto kmene ve směsi s producentem hydrolázy je dále dokumentován v příkladech provedení, aniž se jimi omezuje.

P ř í k l a d

Kmen mikroorganismu *Pseudomonas* sp. byl získán z přírody izolací z filtrátu ornice suspendované ve fyziologickém roztoku, jímž byla očkovaná živná půda obsahující 0,5 % L-AKL, 0,2 % KH_2PO_4 , 0,003 % $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,02 % $\text{MnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,05 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,05 % kvasničného extraktu. Narostlá suspenze byla po naředění vyseta na pevnou živnou půdu stejného složení, kde kvasničný extrakt byl nahrazen 0,5 % L-AKL a směsí vitamínů. Homogenní kultura kmene byla vyseta na živnou půdu stejného složení, avšak namísto 0,5 % L-AKL obsahovala tato půda stejnou koncentraci D-AKL. Z této živné půdy byla monokoloniová kultura podrobena mutagennímu zásahu (10 ml vodné suspenze buněk v ředění 10^6 až 10^8 na Petriho misce o průměru 8 cm podrobena záření UV germicidní lampy 42 W ve vzdálenosti 20 cm, 20 sekund; suspenze po mutagenezi byla vyseta na pevnou živnou půdu stejného složení, která však namísto D- nebo L-AKL obsahovala 0,5 % L-lysinu. Z uvedené živné půdy byla vyočkována největší kolonie, z které byla připravena homogenní kultura, pasážovaná na masopeptonových živných agarrech, a dále potom konzervována lyofilizací.

Vyočkováná konzerva popsáným způsobem získaného kmene *Pseudomonas* sp. byla kultivována

v 10 litrech tekuté živné půdy obsahující 1 % sacharózy, 0,5 % D,L-AKL, 0,05 % kvasničného extraktu, 0,05 % kukuřičného extraktu, 0,79 % K_2HPO_4 , 0,36 % KH_2PO_4 , 0,002 % $MnCl_2 \cdot 5 H_2O$, 0,05 % $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ a filtrát 1% suspenze arašidové mouky; pH média bylo 7,2, kultivace probíhala ve dvacetilitrovém fermentačním tanku z nerezové oceli submersní kultivací za míchání 350 ot./min a vzdušnění 0,4 obj. vzduchu/min 20 hodin při teplotě 29 °C. Za popsaných podmínek bylo získáno 350 g vlhké buněčné pasty uvedeného produkčního kmene.

K důkazu stereospecifické racemizace AKL byl použit vždy jeden z optických antipodů, a to zprvu L-AKL. HCl následujícím způsobem: 5 g vlhké hmoty popsaným způsobem získaných a vyrostlých nativních buněk *Pseudomonas* sp. bylo suspendováno v 50 ml vody, 5 g L-AKL. HCl bylo rozpuštěno v cca 25 ml vody, pH v suspenzi buněk a roztoku L-AKL. HCl bylo upraveno zředěným roztokem KOH za míchání na hodnotu 8,0 a poté obě části vytemperovány na teplotu 37 °C. Po vytemperování suspenze a roztoku L-AKL byly obě složky slity a ihned doplněny vodou na celkový objem 100 ml. Směs byla nepřetržitě míchána při teplotě 37 °C 5 hodin. Po této době byly buňky odstředěny a měřena optická otáčivost supernatantu na spektropolarimetru. Optická otáčivost výchozího roztoku klesla na hodnotu odpovídající 100% racemizaci L-AKL na D,L-AKL. Tento proces byl opakován i s druhým optickým antipodem, tj. D-AKL. HCl, za stejných podmínek a se stejným výsledkem.

P ř í k l a d 2

Pro důkaz kompletní konverze D,L-AKL na L-lysin byla připravena směs producentů obou enzymů, AKL-racemázy a AKL-hydrolázy.

Buňky *Pseudomonas* sp. s racemázovou aktivitou byly připraveny stejným způsobem, jak uvedeno v příkladu 1. Buňky *Cryptococcus* sp. VÚAB 440 s L-AKL hydrolázovou aktivitou byly připraveny následujícím způsobem: Kmen *Cryptococcus* sp. byl kultivován v 10 l tekuté živné půdy obsahující 0,5 % sacharózy, 2,0 % D,L-AKL, 0,5 % kvasničného extraktu, 0,95 % K_2HPO_4 , 0,2 % KH_2PO_4 , 0,02 % $MnCl_2 \cdot 5 H_2O$, 0,05 % $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$; pH média bylo 7,5, kultivace probíhala ve dvacetilitrovém fermentačním tanku z nerezové oceli submersní kultivací za míchání 350 ot./min a vzdušnění 0,3 obj. vzduchu/min při teplotě 29 °C. Za popsaných podmínek bylo získáno 500 g vlhké buněčné pasty producenta L-AKL-hydrolázy.

Úplná konverze D,L-AKL na L-lysin byla provedena následujícím způsobem. Reakční směs obsahovala 250 g vlhké hmoty (50 mg/ml) *Pseudomonas* sp. a 125 g vlhké hmoty buněk (25 mg/ml) *Cryptococcus* sp. VÚAB 440 a 500 g D,L-AKL-HCl (608 mmol) v celkovém, vodou doplněném objemu 5 litrů a pH reakční směsi upravené zředěným KOH na hodnotu 8,0. Reakční směs byla míchána při teplotě 40 °C nepřetržitě 10 hodin. Po této době bylo v reakční směsi zjištěno 124 mg L-lysinu-HCl/ml, tj. 608 mmol L-lysinu, což odpovídá výtěžku 620 g L-lysinu monochloridu, tj. 100% konverzi D,L-aminokaprolaktamu na L-lysin.

P ř í k l a d 3

25 g nativních buněk (vlhké buněčné pasty) *Pseudomonas* sp., získaných, jak je uvedeno v příkladu 1, bylo ošetřeno za chladu acetonem a bylo získáno 3,87 g suché hmoty tohoto producenta.

20 g vlhké pasty *Cryptococcus* sp. VÚAB 440, získaných, jak je uvedeno v příkladu 2, bylo ošetřeno za chladu acetonem a bylo získáno 3,11 g suché hmoty tohoto producenta.

S acetonem ošetřenými buňkami producentů obou enzymů byla provedena kompletní konverze D,L-AKL na L-lysin takto:

Reakční směs obsahovala 1,5 g (15 mg/ml acetonové sušiny) *Pseudomonas* sp., 0,4 g

(4 mg/ml acetonové sušiny) *Cryptococcus* sp. VÚAB 440, 10 g D,L-AKL-HCl (608 mmol) a vodu v celkovém objemu 100 ml; pH reakční směsi bylo upraveno zředěným roztokem KOH na hodnotu 8,0. Reakční směs byla nepřetržitě míchána po dobu 9 hodin při teplotě 40 °C. Po této době byl z reakční směsi získán roztok obsahující 124 mg L-lysinu . HCl/ml (608 mmol), což odpovídá 100% konverzi D,L-aminokaprolaktamu na L-lysin.

P ř í k l a d 4

Nativní buňky *Pseudomonas* sp., které vyrostly za podmínek, jak uvedeno v příkladu 1 a nativní buňky *Cryptococcus* sp. VÚAB 440, které vyrostly, jak je uvedeno v příkladu 2, byly suspendovány v demineralizované vodě v poměru 75 mg/ml vlhké hmoty producenta racemázy a 25 mg/ml vlhké hmoty producenta hydrolázy do 20% roztoku D,L-AKL . HCl (20 g/100 ml, tj. 1 216 mmol); pH reakční směsi bylo upraveno zředěným roztokem KOH na hodnotu 8,0 a směs byla nepřetržitě míchána po dobu 28 hodin při 40 °C. Z reakční směsi byl získán roztok obsahující 220 mg L-lysinu . HCl/ml (1 205 mmol), což odpovídá 99,2 % konverzi 20% roztoku D,L-aminokaprolaktamu na L-lysin.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Kmen mikroorganismu *Pseudomonas* sp. CCM 3 443 s racemázovou aktivitou D,L-alfa-amino-epsilon-kaprolaktamu pro výrobu L-lysinu.