



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

240712
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 1/20/

(22) Přihlášeno 25 07 84
(21) (PV 5715-84)

(40) Zveřejněno 16 07 85

(45) Vydáno 15 08 87

[75]

Autor vynálezu

PLACHÝ JIŘÍ dr. CSc., ROZTOKY u Prahy; ULBERT STANISLAV ing.,
PRAHA; BUČKO MICHAL ing. CSc.; HANO ALEXANDR;
PAPAY JULIUS ing., BANSKÁ BYSTRICA; BARTA MIROSLAV dr., PRAHA;
MIKLÁŠ EMIL ing., BANSKÁ BYSTRICA

[54] Kmen mikroorganismu *Brevibacterium flavum* CCM 3736, produkující lysin

1

2

Účelem řešení je zvýšení produkce esenciální aminokyseliny lysinu, který syntetizuje a v médiu hromadí mutanta bakteriálního druhu *Brevibacterium flavum*. Působením mutagenu a aplikací selektivního média byla izolována mutanta rezistentní k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu a dependentní na homoserin a leucin, která kultivována 96 h v médiu s vhodným zdrojem uhlíku, dusíku a s minerálními solemi za aerobních podmínek a při 28 °C a neutrálním pH hromadila v prostředí 46 g/l L-lysínu. Lysin, využívaný především jako doplněk krmiv, lze takto vyrábět s využitím mikroorganismů běžnými biotechnologickými postupy.

Vynález se týká nového kmene mikroorganismu druhu *Brevibacterium flavum*, rezistentního na analog lysinu a dependentního na homoserin a leucin, hromadícího při kultivaci v médiu s vhodným zdrojem uhlíku, dusíku a minerálních solí za aerobních podmínek a při neutrálním pH vysoká množství lysinu.

Při fermentační přípravě lysinu se jako vhodné produkční organismy osvědčily regulační mutanty rezistentní k analogům aminokyselin, které nahradily dříve používané auxotrofní mutanty, především potom mutanty dependentní na homoserin.

Z producentů lysinu jsou jako nejvhodnější uváděny v literatuře mutanty s více genetickými znaky, tj. například mutanty rezistentní k analogu lysinu, které kromě této rezistence ještě vykazovaly dependenci na některé aminokyseliny.

Sano a Shilo (Sano K. — I. Shilo: J. Gen. Appl. Microbiol. 16: 373, 1970) zjistili, že některé z mutantů druhu *Brevibacterium flavum* rezistentních k analogu lysinu, tj. k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu (AEC), hromadí v médiu relativně vysoká množství lysinu (okolo 30 g/l).

Významnými producenty lysinu byly také mutanty druhu *Brevibacterium lactofermentum*, které byly rezistentní k AEC a vyžadovaly k růstu leucin (Tosaka O. — K. Takinami — Y. Hirose: Agr. Biol. Chem. 42: 1181, 1978).

Produkcí lysinu převyšuje dosud známé zmíněné kmeny nový kmen *Brevibacterium flavum*, uložený v Československé sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně v Brně, třída Obránců míru 10, pod označením CCM 3736, který je předmětem vynálezu.

Hlavní výhodou nového kmene podle vynálezu je podstatně zvýšená produkce lysinu, podmíněná jednak rezistencí na analog lysinu, jednak dependencí na homoserin a leucin. Zvýšená produkce lysinu je patrná při dvoustupňové kultivaci tohoto kmene v produkčním médiu s sacharózou, kyselým hydrolyzátem arašídové mouky, kukuřičným výluhem a minerálními solemi v baňkách inkubovaných na rotační třepačce při 28 °C a pH udržovaném čpavkovou vodou na hodnotě 7,0. Za uvedených podmínek se po 96 h kultivace dosáhne produkce 46 g/l.

Nový kmen *Brevibacterium flavum* CCM 3736 je charakterizován následujícími morfologicko-kultivačními a fyziologickými vlastnostmi:

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

Na masopeptonovém agaru tvoří okrouhlé, hladké, žluté kolonie s rovnými okraji.

Na masopeptonovém šikmém agaru pokrývá žlutý nárůst celý povrch agaru.

Při růstu organismu v bujónu dochází k tvorbě zákalu a sedimentu, ne však blanky.

Na krevním agaru tvoří tento organismus okrouhlé, žluté kolonie, nehemolyzující, s rovnými okraji.

Fyziologické vlastnosti:

Optimální teplota — 28 až 30 °C.

Optimální pH — 6,8 až 7,2.

Aerobní organismus.

Želatinu neztékucuje.

Celulózu nerozkládá.

Glukózu, fruktózu, sacharózu zkvašuje.

Škrob hydrolyzuje jen velmi slabě.

Dusičnany redukuje.

Sírovodík netvoří.

Indol netvoří.

Test na katalázu: pozitivní.

Voges-Proskauerův test: negativní.

K růstu vyžaduje z vitamínů biotin a z aminokyselin homoserin a leucin.

Výchozí kmen *Brevibacterium flavum* CCM 251 se kultivuje 24 hod v kompletním médiu a buněčná suspenze po promytí fosfátovým puforem (pH — 7,2) se vystaví 18-hodinovému působení 0,05 M roztoku ethylmethansulfonátu v pufru (pH — 7,2). Suspenze po aplikaci mutagenu se 2X promyje sterilní destilovanou vodou a vyočkuje se po naředění na plotny s minimálním médiem doplněným kromě biotinu a thiaminu ještě 10 mg/ml S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu, 0,01 mg/ml L-homoserinu a 0,01 mg/ml L-leucinu.

Kolonie, které vyrostly na plotnách s homoserinem a leucinem, se vyočkují na šikmé masopeptonové agary. Isoláty vyrostlé na šikmých agarech se testují na stupeň rezistence, na dependenci na homoserin a na leucin a dále je zjišťována schopnost produkovat lysin.

Podrobnosti vynálezu vyplývají z následujících příkladů provedení.

Příklad 1

Mikroorganismus *Brevibacterium flavum* CCM 251 se očkuje do 60 ml kompletního média v 750 ml Erlenmayerově baňce následujícího složení:

glukóza	0,5 %
hydrolyzátní kaseinu	1,0
výluh droždí	0,5
dihydrogenfosforečnan draselný	0,3
hydrogenfosforečnan draselný	0,1
roztok solí	1,0 ml
	na 1 000 ml média
agar	2,5
	na 1 000 ml média

(Roztok solí je roztok 0,5 g heptahydrátu síranu železnatého a 0,5 g pentahydrátu síranu manganatého ve 100 ml vody.)

Zaočkovaná baňka se inkubuje ne reciproke třepačce (počet kyvů 91/min, délka kyvu = 9 cm) při 28 °C 24h. Buněčná suspenze se potom 2X promyje fosfátovým pufrům (pH — 7,2) a po promytí se vystaví 18hodinovému působení 0,05 M roztoku ethylmethansulfonátu ve fosfátovém pufru (pH — 7,2). Potom se buněčná suspenze 2X promyje sterilní destilovanou vodou, vhodně naředí a zředěnou suspenzí se očkuje plotny s minimálním médiem následujícího složení:

glukóza	0,1 %
citran sodný	0,04
hydrogenfosforečnan draselný	0,2
dihydrogenfosforečnan draselný	roztok 14 g ve 100 ml vody; 50 ml roztoku na 1 000 ml média
síran amonný	0,1
síran hořečnatý kryst.	0,01
roztok solí Fe a Mn	jako výše
agar	2,5

Minimální médium se doplňuje roztokem biotinu a thiaminu. Do 1 000 ml média se přidá 1 ml roztoku 0,02 g biotinu ve 100 ml vody a 1 ml roztoku 0,04 g thiaminu ve 100 ml vody. Potom se médium ještě doplní 10 mg/ml S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu a 0,01 mg/ml L-homoserinu.

Plotny se inkubují 96 h při 28 °C a kolonie vyrostlé na plotnách se sterilními razídky přenesou na plotny s minimálním médiem obsahujícím kromě biotinu, thiaminu jen homoserin a na plotny s 0,01 mg/ml L-homoserinu a 0,01 mg/ml L-leucinu. Kolonie, které vyrostly na plotnách s homoserinem a leucinem, ne však na plotnách obsahujících jen homoserin, se vyočkují na masoptonové agary. Izoláty vyrostlé na šik-

mých agarech se testují na stupeň rezistence na analog lysinu, na dependenci na homoserin a leucin a na schopnost produkovat lysin.

Příklad 2

Kulturou kmene *Brevibacterium flavum* CCM 3736, 24 h starou, se očkuje 60 ml inokulačního média v 500 ml varných baňkách. Stejným způsobem se naočkuje kontrola, kterou je výchozí kmen *Brevibacterium flavum* CCM 251. Složení inokulačního média je následující:

sacharóza	2,5 %
kukuřičný výluh (65% sušiny)	3,0
pH	7,0

Zaočkované baňky se inkubují na rotační třepačce (220 otáček za min., výstředník — 2,5 cm) 24 h při 28 °C. 2 % (obj.) se očkují 500 ml varné baňky s 20 ml produkčního média následujícího složení:

sacharóza	18,0 %
kyselý hydrolyzát arašidové mouky (obj.)	30,0 %
kukuřičný výluh (65% suš.)	1,0 %
dihydrogenfosforečnan draselný	0,2
síran hořečnatý kryst.	0,03
uhličitan vápenatý	2,0
síran železnatý kryst.	0,002
síran manganatý kryst.	0,002
biotin	0,00005
thiamin (hydrochlorid)	0,0002
pH	7,0

Během kultivace se upravuje pH ve 24hodinových intervalech čpavkovou vodou na hodnotu 7,0 až 7,2. Doba kultivace je 96 h. Lysin se stanovuje manometricky s použitím dekarboxylázy lysinu.

Produkce lysinu v 96. h kultivace činila 46 g/l (produkce kontroly 40 g/l).

PREDMĚT VYNÁLEZU

Kmen mikroorganismu *Brevibacterium flavum* CCM 3736 produkující lysin, rezistent-

ní k S-(2-aminoethyl)-L-cysteinu, dependentní na homoserin a leucin.