

# Biosyntéza L-lysinu u kmene *Corynebacterium glutamicum* 10-20/60

## Nestandardní zdroje uhlíku

Dr. František SMÉKAL, Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

Dr. N. I. ŽDANOVA, Dr. T. V. LEONOVA, Dr. Z. M. ZAJCEVA, Vsesvazový vědecko-výzkumný ústav genetiky, Moskva

Tradičně používanými surovinami pro fermentační přípravu L-lysinu jsou sacharosa a melasa a dusíkaté anorganické a organické komplexní zdroje, které zabezpečují růst produkčních mikroorganismů. Pro biosyntézu aminokyselin se dále aplikují jako zdroje uhlíku látky petrochemické povahy (syntetický ethanol, kyselina octová, glykoly apod.). Mikroorganismy produkovající L-lysin asimilují uvedené suroviny pro tvorbu biomasy a produkci extracelulárních metabolitů s různou intenzitou podle typu uhlíkatého zdroje v růstovém médiu. Tím je určována různá koncentrace živin na počátku kultivace, řízení fermentačního postupu, způsob dávkování uhlíkatého zdroje v průběhu kultivace, úprava pH, doba fermentace apod. Pro každý typ aplikovaného zdroje uhlíku je zapotřebí vypracovat složení inokulačního a fermentačního média a stanovit podmínky pro optimální režim fermentace esenciální aminokyseliny. Z korynebakteriálních producentů L-lysinu, který jako jediný univerzálně syntézuje L-lysin na různých typech uhlíkatých zdrojů, je mutantní kmen *Corynebacterium glutamicum* 10-20/60. Byl připraven v laboratořích VNII-genetiky v Moskvě. Je charakterizován auxotrofii na homoserin a dále je rezistentní na analog L-lysinu — S-aminoethyl-L-cystein. V práci jsou popsány údaje o produkci L-lysinu na klasických a nestandardních zdrojích uhlíku a jejich kombinacích, které jsou výsledkem čs.-sovětské spolupráce v oblasti výzkumu této významné esenciální aminokyseliny.

## MATERIÁL A METODY

Produkční kmen *Corynebacterium glutamicum* 10-20/

/60 byl uchováván pasážováním na MPA agarech po 21 dnech a dále uložením při 4°C. Pro sledování biosyntézy L-lysinu na sacharose, kyselině octové, hydrolyzátech cereálního škrobu a hydrolyzátu papíru bylo použito inokulačního média tohoto složení: sacharosa techn. 20 g, octan sodný kryst. 40 g, kukuřičný extrakt 30 g, voda dest. ad 1000 ml; pro studium produkce L-lysinu na melase a kombinovaných zdrojích uhlíku bylo použito inokulačního média tohoto složení: melasa řepná 50 g, kukuřičný extrakt 30 g, voda dest. ad 1000 ml; pH médií mezi 7,0–7,2, plnění 500 ml varných baněk po 50 ml média, sterilace při 0,12 MPa po dobu 30 minut.

Složení fermentačních médií pro biosyntézu L-lysinu na sacharose, melase a kyselině octové je popsáno v dřívějších pracích [1, 2, 3]. Pro biosyntézu L-lysinu na hydrolyzátech cereálního škrobu bylo použito média o tomto složení: hydrolyzát ječného škrobu (120 mg redukujících látek/ml) 700 ml, hydrolyzát arašídové mouky 200 ml, kukuřičný extrakt 10 g, hydrogenfosforečnan draselný 1 g, síran hořečnatý kryst. 0,1 g, uhličitan vápenatý mikromletý 30 g, voda dest. ad 1000 ml; složení fermentačního média pro biosyntézu L-lysinu na hydrolyzátu papíru: enzymový hydrolyzát papírové drtě (5 % redukujících látek/ml) 600 ml, hydrolyzát arašídové mouky 150 ml, kukuřičný extrakt 10 g, hydrogenfosforečnan draselný 1 g, síran hořečnatý kryst. 0,1 g, uhličitan vápenatý mikromletý 30 g, voda dest. ad 1000 ml; složení fermentačního média pro biosyntézu L-lysinu na bázi kombinovaných zdrojů uhlíku: melasa řepná 100 g, hydrolyzát arašídové mouky 150 ml, kukuřičný extrakt 10 g, hydrogenfosforečnan draselný 1 g, síran hořečnatý kryst. 0,1 g, uhličitan vápenatý mikromletý 30 g, voda

dest. ad 1000 ml; od 24. hodiny kultivace se do baněk dvakrát denně dávkuje 1 ml acetát-melasové směsi o složení: koncentrovaná kyselina octová 26 ml, octan amonné kryst. 6,25 g, melasa řepná 10 g, voda dest. ad 100 ml; úprava pH pomocí 10% amoniaku na hodnotu 7,0—7,2 po aplikaci uhlíkaté směsi. Fermentační baňky se plní po 20 ml médií, sterilace při 0,12 MPa po dobu 30 minut, kultivace probíhá na rotační třepačce (6,7 Hz) při teplotě 29 °C. L-lysin se stanovuje oscilopolarograficky, redukující látky a dusík metodami popsánými dříve [4, 5].

### VÝSLEDKY A DISKUSE

Základní pokusy u kmenů *Corynebacterium glutamicum* a *Brevibacterium flavum* byly zaměřeny na sledování biosyntézy L-lysinu na fermentačním médiu se standardní koncentrací sacharosy (18 % hm.) a fermentačním médiu s acetátem jako hlavním zdrojem uhlíku s dávkováním acetátové směsi v průběhu kultivace. Kontrolní kmen *Brevibacterium flavum* se vyznačuje stejnými genetickými determinantami jako sovětský kmen *Corynebacterium glutamicum*. Fermentace byla provedena v baňkách za standardních podmínek kultivace na rotační třepačce při teplotě 29 °C. Po 96 hodinách kultivace byl u obou kultur stanoven obsah L-lysinu. Výsledky produkcí jsou uvedeny v tabulce 1. Zjištění hodnoty produkce lysinu ukazuje, že na fermentačním médiu se sacharosou nemí praktických rozdílů v syntéze lysinu u obou testovaných kmenů a výsledky jsou dobře srovnatelné. V případě kultivace na fermentačním médiu s acetátem jako hlavním zdrojem uhlíku mohou být rozdíly v produkciích způsobeny nižší rychlosťí utilizace acetátu kmenem *Brevibacterium flavum* oproti kmenu *Corynebacterium glutamicum*.

Tabulka 1. Produkce L-lysinu u kmene *Corynebacterium glutamicum* 10—20/60 a *Brevibacterium flavum* na fermentačních médiích se sacharosou a kyselinou octovou

Produkční kmen	Zdroj uhlíku	Produkce L-lysinu [g/l média/96 hodin]
<i>Corynebacterium glutamicum</i> 10—20/60	18 % hm. sacharosy kyselina octová (4% Na-acetát + acetátová směs)	38 g 27 g
<i>Brevibacterium flavum</i>	18 % hm. sacharosy kyselina octová (4% Na-acetát + acetátová směs)	40 g 23 g

Podobně byla testována produkční schopnost obou kmenů na fermentačním médiu s melasou s koncentracemi 15 % hm. a 18 % hm. Výsledky stanovení L-lysinu poukazují na vyrovnanost produkce u obou producentů lysinu při aplikaci uvedených koncentrací uhlíkatého zdroje. Výsledky jsou shrnutы v tabulce 2. Dále bylo provedeno srovnání produkčních vlastností obou kmenů na fermentačních médiích, které jako hlavní zdroj asi-

Tabulka 2. Produkce L-lysinu u kmene *Corynebacterium glutamicum* 10—20/60 a *Brevibacterium flavum* na fermentačních médiích s melasou

Produkční kmen	Konc. melasy reduk. látky/ml	Produkce L-lysinu [g/l média/96 hodin]
<i>Corynebacterium glutamicum</i> 10—20/60	15 % hm. melasy 68 mg reduk. látek v 1 ml	23 g 25 g
<i>Corynebacterium glutamicum</i> 10—20/60	20 % hm. melasy 108 mg reduk. látek v 1 ml	30 g 28 g

Tabulka 3. Produkce L-lysinu u kmene *Corynebacterium glutamicum* 10—20/60 a *Brevibacterium flavum* na fermentačním médiu s hydrolyzátom ječného škrobu

Produkční kmen	Hydrolyzát ječného škrobu (dávkování uhlíkaté směsi)	Produkce L-lysinu [g/l média/96 hodin]
<i>Corynebacterium glutamicum</i> 10—20/60	kontrola dávkování uhlíkaté směsi	12 g 24 g
<i>Brevibacterium flavum</i>	kontrola dávkování uhlíkaté směsi	14 g 26 g

Tabulka 4. Produkce L-lysinu u kmene *Corynebacterium glutamicum* 10—20/60 a *Brevibacterium flavum* na kombinovaných uhlíkatých zdrojích (10 % hm. melasy + acetát — melasová směs)

Produkční kmen	Doba kultivace hodiny	Produkce L-lysinu [g/l média]
<i>Corynebacterium glutamicum</i> 10—20/60	24 48 72 96	10 g 15 g 25 g 26 g
<i>Brevibacterium flavum</i>	24 48 72 96	7 g 13 g 21 g 23 g

milovatelného uhlíku obsahovaly enzymové hydrolyzaty škrobové frakce ječné mouky a jako zdroj dusíku standardní hydrolyzát arašidové mouky. Od 24. hodiny kultivace byly do baněk dávkovány dvakrát denně 2 ml hydrolyzátu cereálního škrobu (220 mg redukujících látek/ml) a současně pH média upravováno 10% roztokem amoniaku na hodnotu 7,0—7,2. Stanovení L-lysinu v 96. hodině kultivace ukazuje, že produkce u obou typů

produkčních kmenů jsou dobře srovnatelné. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Schopnost mutantního kmene *Corynebacterium glutamicum* produkovat L-lysín na melase jako jediném zdroji uhlíku byla dále ověřována a rozšířena v pokusech s použitím kombinovaných zdrojů ve formě směsi melasy a kyseliny octové. Do 24. hodiny kultivace probíhal růst kultury pouze na melase a dále byla do fermentačních baněk dávkována kombinovaná směs obou typů uhlíkatých zdrojů při současné standardní úpravě pH amoniakem. Fermentace probíhala ve fermentačních baňkách po dobu 96 hodin. Výsledky produkci L-lysínu uvádí tabulka 4. Z uvedených hodnot je zřejmé, že u kmene *Corynebacterium glutamicum* je dosahováno vyšší produkční rychlosť a výtěžku L-lysínu.

Perspektivním zdrojem uhlíku pro biosyntézu L-lysínu mohou být enzymové hydrolyzát papíru získané po působení celulásového komplexu *Trichoderma viride*. Enzymovou hydrolyzou papírové drtí lze získat roztok obsahující 1,6 % redukujících látek/ml a po zahušení zdroj uhlíku s obsahem 4,8 % redukujících látek/ml. Vedle uvedeného zdroje uhlíku obsahuje fermentační médium všechny růstové látky a minerální složky, které jsou standardně v ostatních typech médií. Výsledky produkce L-lysínu u obou typů produkčních kmenů jsou uvedeny v tabulce 5. Ukazuje se, že u kmene *Corynebacterium glutamicum* je dosahováno vyšší produkce než u mutanty *Brevibacterium flavum*.

Tabulka 5. Produkce L-lysínu u kmenů *Corynebacterium glutamicum* 10—20/60 a *Brevibacterium flavum* na fermentačním médiu s enzymovým hydrolyzátem papíru (4,8 mg reduk. látek/ml)

Produkční kmen	Produkce L-lysínu [g/1 média/72 hodin]
<i>Corynebacterium glutamicum</i> 10—20/60	12 g
<i>Brevibacterium flavum</i>	10 g

Předložená práce s dosaženými výsledky produkce L-lysínu u mutanty *Corynebacterium glutamicum* ukazuje na vysokou schopnost biosyntézy jak na klasických zdrojích, tak i nestandardních uhlíkatých substrátech. Charakteristickou vlastností je univerzálnost produkční mutanty *Corynebacterium glutamicum* na rozdíl od jiných typů korynebaktérií, které produkují odpovídající množství L-lysínu pouze na sacharose nebo melase, jako např. *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21 526. Dosažované parametry produkce L-lysínu se vyrovňávají hodnotám produkce L-lysínu některých produkčních mutant *Brevibacterium flavum* používaných v průmyslovém měřítku při výrobě této významné esenciální aminokyseliny.

#### Literatura

- [1] PELECHOVÁ, J., SMÉKAL, F., KOURA, V., KRUMPHANZL, V.: Fol. Microbiol., **25**, 1980, s. 341.
- [2] SMÉKAL, F., MAZALOVÁ, M., KINDLOVÁ, E., ULBERT, S., BULANT, V.: Kvas. prům., **28**, 1982, s. 74.
- [3] SMÉKAL, F., KUČEROVÁ, H., ULBERT, S.: Čs. autorské osvědčení č. 195 522, 1979.
- [4] BULANT, V., BULANTOVÁ, H., SMÉKAL, F.: Proceed. „Heyrovsky Memorial Congress on Polarography“ Part II, Praha 1980, s. 26.
- [5] SMÉKAL, F., PELECHOVÁ, J., HLADÍKOVÁ, B.: Kvas. prům., **28**, 1982, s. 108.

Smékal, F. - Ždanova, N. I. - Leonova, T. V. - Zajceva, Z. M.: Biosyntéza L-lysínu u kmene *Corynebacterium glutamicum* 10—20/60. Kvas. prům., **29**, 1983, č. 9, s. 208—210.

Produkční mutanta *Corynebacterium glutamicum* 10—20/60, vyžadující k růstu homoserin a současně je rezistentní na S-aminoethylcystein, hromadí ve fermentačním médiu na klasických zdrojích uhlíku (sacharosa, melasa) L-lysín podobně jako na nestandardních uhlíkatých surovinách (kyselině octové, hydrolyzátech cereálních škrobů, kombinacích melasa — acetát a enzymových hydrolyzátech papíru). Univerzální asimilaci různých uhlíkatých zdrojů, odpovídající produkci L-lysínu a způsobu fermentace se uvedená mutanta podobá produkčnímu kmenu *Brevibacterium flavum* se stejnou genetickou determinací.

Смекал, Ф., Жданова, Н. И., Леонова, Т. В.. Зайцева, З. М.: Биосинтез Л-лицина штаммом *Corynebacterium glutamicum* 10—20/60. Квас. прум., **29**, 1983, № 9, стр. 208—210.

Продукционный мутант *Corynebacterium glutamicum* 10—20/60, требующий для своего роста гомосерин и одновременно резистентный в отношении к С-аминоэталцистину, в ферментационной среде на классических источниках углерода (сахароза, меласса) накапливает Л-лицин подобно как на нестандартных углеродистых видах сырья (уксусной кислоте, гидролизатах цереальных крахмалов, комбинациях меласса-acetат и энзимных гидролизатах бумаги). При универсальной ассимиляции разных углеродистых источников, соответствующей продукции Л-лицина и методе ферментации приведенный мутант похож на продукционный штамм Бревибактериум флавум с той же генетической детерминацией.

Smékal, F. - Ždanova, N. I. - Leonova, T. V. - Zajceva, Z. M.: Biosynthesis of L-Lysine with the Strain *Corynebacterium glutamicum* 10—20/60. I. Non-Standard Sources of Carbon. Kvas. prům. **29**, 1983, No. 9, p. 208—210.

The production mutant of *Corynebacterium glutamicum* 10—20/60 which needs homoserine for growth and which is resistant to S-amino-ethylcysteine, accumulates L-lysine in a fermentation medium. The accumulation of L-lysine was observed in fermentations with standard carbon sources (Saccharose, molasses) as well as with non-standard carbon sources (acetic acid, hydrolysates of cereal starches, mixtures of molasses-acetate and enzyme hydrolysates of paper). This mutant is similar to the production strain of *Brevibacterium flavum* with the same genetic determination from the standpoint of the assimilation of various carbon sources, the corresponding L-lysine production and the type of fermentation.

Smékal, F. - Ždanova, N. I. - Leonova, T. V. - Zajceva, Z. M.: Biosynthese des L-Lysins bei dem Stamm *Corynebacterium glutamicum* 10—20/60. Kvas. prům. **29**, 1983, Nr. 9, S. 208—210.

Bei der Produktionsmutante *Corynebacterium glutamicum* 10—20/60, die zum Wachstum Homoserin erfordert und zugleich Resistenz gegenüber S-Aminoäthylcystein aufweist, wurde die Anhäufung des L-Lysins auf klassischen Kohlenstoffquellen (Saccharose, Melasse) ähnlich wie auf nicht üblichen C-haltigen Rohstoffen (Essigsäure, Hydrolysate cerealer Stärke, Kombinationen Melasse-Acetat und Enzym-Papierhydrolysaten) festgestellt. In ihrer universalen Assimilation verschiedener Kohlenstoffquellen, die der L-lysin-Produktion und der Art der Fermentation entspricht, ist die erwähnte Mutante dem Produktionsstamm *Brevibacterium flavum* mit identischer genetischer Determination ähnlich.