

# Produkce aminokyselin u mutantních kmenů

## Brevibacterium sp. M-27

579.663

RNDr. M. KONÍČKOVÁ-RADOCHOVÁ, CSc., MUDr. JIŘÍ KONÍČEK, CSc., RNDr. VÁCLAV RYTÍŘ, CSc., Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha, RNDr. FRANTIŠEK SMÉKAL, CSc., Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

**Klíčová slova:** mikroorganismus, mutageneze, *Brevibacterium sp. M-27*, produkce L-lysinu, biosyntéza aminokyselin

V problematice studia biosyntézy L-lysinu mají významné postavení kmeny *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum* a *Brevibacterium sp.* Jsou to většinou mutantní auxotrofní kmeny, které vyžadují k růstu např. homoserin, leucin, nebo jiné aminokyseliny. Další skupinou jsou regulační mutanty, které se vyznačují rezistencí vůči analogům aminokyselin, např. S-aminoethyl-L-cysteinu, aminoxydroxyvalerové kyselině apod. U vysokoprodukčních mutant jde většinou o kombinaci znaků rezistence k analogům a auxotrofie na aminokyseliny. Z hlediska nutričních požadavků jsou významné produkční kmeny *Corynebacterium glutamicum* s rezistenčemi pouze k analogům aminokyselin [1].

V předchozí práci byl studován mutační diapazon kmene *Brevibacterium sp. M-27*, a to UV - zářením a N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidinem (MNG). Cílem práce [2] bylo zhodnotit mutabilitu modelu a připravit kolekce kmenů změněných fenotypů pro studium genetických přenosů u brevibakterií. Na základě získaných zkušeností byla další práce zaměřena na možnost přípravy nových producentů L-lysinu a dalších aminokyselin.

### MATERIÁL A METODY

V pokusech bylo použito kmene *Brevibacterium sp. M-27* s nízkou produkcí L-lysinu; kmen je charakterizován rezistencí vůči S-aminoethyl-L-cysteinu a auxotrofii na homoserin. Udržuje se na masopeptonových agarech, je pasážován po 3 týdnech a uchováván při 5 °C.

V mutačních pokusech byla použita kultura buněk z logaritmické fáze, vyrostlá v tekutém kompletním médiu při 28 °C; jako mutagen byl použit MNG (Koch Light, England) v koncentraci 1 mg · ml<sup>-1</sup> v roztoku tris-maleinového pufru a minimálního média. Kultivační média, složení roztoků a metodický postup přípravy a identifikace mutant byly popsány v předcházející práci [2]. Složení kultivačních médií, způsob fermentační přípravy L-lysinu a jeho stanovení byly publikovány dříve [3]. Stanovení aminokyselin ve fermentačním médiu bylo prováděno chromatograficky a na automatickém analyzátoru aminokyselin AA-881 (Mikrotechna Praha). Ověřování produkčních vlastností mutantních kmenů v laboratorním měřítku v baňkách a uvedené techniky a metody jsou publikovány v práci [4].

### VÝSLEDKY A DISKUSE

V rámci studia mutageneze pomocí MNG byl u kmene *Brevibacterium sp. M-27* připraven soubor auxotrofních mutant včetně vícenásobných auxotrofních kmenů, dále pigmentovaných kmenů a auxotrofních mutant se změnou pigmentace. Auxotrofní mutanty vykazují výživové požadavky v oblasti aminokyselin a bází nukleových kyselin. V dependenci na aminokyseliny převládá požadavek na arginin, cystein, cystin, leucin, isoleucin a histidin. Tyto fenotypy se vyskytují ve vyšších frekvencích. Dependence na prolin, serin, lysin a asparagovou kyselinu jsou ojedinělé. V oblasti biosyntézy purinů dochází pravděpodobně k řadě genetických bloků, a proto byly získány mutanty s různou dependencí. Dvojitě auxotrofní mutanty jsou dependentní na některou aminokyselinu a bázi. Vhodným genetickým znakem pro studium mutageneze je změna pigmentace kolonií *Brevibacterium sp. M-27*. Byly získány mutanty vícenásobně geneticky značené auxotrofii a změnou pigmentace. Vybrané auxotrofní kmeny vykazovaly výhovující stabilitu získaných genetických změn s frekvencí spontánních reverzí v rozmezí 10<sup>-6</sup>–10<sup>-10</sup>.

Mutantní kmeny s výhovujícími růstovými parametry a stabilitou mutačních změn byly testovány na produkci

L-lysinu a dalších aminokyselin standardním fermentačním postupem v baňkách. U části auxotrofních a prototrofních kmenů se změnou pigmentace odpovídala produkce L-lysinu průměrným hodnotám produkce rodičovského kmene. Přibližně 70 % kmenů ze souboru nepigmentovaných i pigmentovaných mutant mělo podstatně sníženou produkci; v mnoha případech došlo ke ztrátě schopnosti biosyntézy L-lysinu. Takové kmeny byly většinou dependentní na báze nukleových kyselin, isoleucin, valin, cystin, cystein, lysin a prolin. Produkce L-lysinu a dalších aminokyselin u této skupiny mutantů ukazuje tabulka 1.

U kmenů s geneticky blokovanou syntézou L-lysinu byla dále ověřována schopnost syntézovat další aminokyseliny. Byly prokázány kmeny produkující alanin, valin

Tabulka 1. Produkce aminokyselin u auxotrofních mutant *Brevibacterium sp. M-27*

Produkční kmen	Produkce aminokyselin	
	L-lysinu v % produkce rodič. kmene	jiné aminokyseliny g · l <sup>-1</sup> za 72 h
his	40,0	
ileu, val	0	
cystin	0	
cystein	0	
cystein	39,3	valin 4,8
cystein	20,0	
cys(cys)	8,7	
cys (arg; lys)	0	
cys(cys; glu; his)	0	
cys (his; glu; cys)	42,0	valin 6,0 valin 3,0
lys(cys; his; glu)	0	
lys(arg)	33,2	valin 5,0 alanin 4,0
lys(his)	0	
pur	0	kys. glutamová 3,0
gua	0	valin 8,0
gua(xan; hyp)	0	
gua(xan)	0	
ade(hyp)	6,4	kys. glutamová 4,0
ade(gua)	5,8	
xan(hyp)	0	
ura	23,5	alanin 3,0
try ade	21,6	alanin 4,0

a kyselinu glutamovou. Tyto aminokyseliny jsou syntézovány v malém množství i prototrofními kmeny izolovanými z přirozených substrátů [5]. Produkce alaninu a kyseliny glutamové se pohybují mezi 3–4 g · l<sup>-1</sup> a u valinu činí produkce 3–8 g · l<sup>-1</sup> za 72 hodin kultivace. Produkce L-lysinu u pigmentovaných mutant ukazuje tabulka 2. Z celého souboru kmenů tvoří výjimku jen několik auxo-

Tabulka 2. Pigmentové auxotrofní mutanty *Brevibacterium sp. M-27* se sníženou produkcií L-lysinu

Produkční kmen	Pigmentace	Syntéza L-lysinu v % produkce rodič. kmene
cys(his)	růžový	0
pur	oranžový	0
pur	růžový	0
xan(hyp; ade)	oranžový	38,3
ura	bílý	0
ura	růžový	43,5
tvr xan(hyp; ade)	oranžový	13,0
ileu val hyp	růžový	56,4

trofních mutant se změnou pigmentace. Produkce L-lysinu byla u nich zvýšena až o 50 % při velmi nízké biosyntéze alaninu a valinu. Podobné typy mutant *Corynebacterium glutamicum* popisuje zahraniční patentová literatura [6]. Tyto produkční kmeny jsou schopny syntézovat L-lysin jednak na klasických zdrojích uhlíku jako je sacharosa, ale jsou významnými producenty aminokyselin na nestandardním zdroji uhlíku jako je kyselina octová.

Výsledky experimentů ukázaly, že 60 % auxotrofních kmenů se vyznačuje stabilitou genetických změn; z tohoto souboru přibližně 70 % kmenů má sníženou produkci L-lysinu o více než 50 % proti hodnotám produkce u rodičovského kmene nebo má geneticky blokovanou syntézu L-lysinu. Z těchto mutant asi 30 % syntézovalo další aminokyseliny. Pouze několik kmenů vykazovalo zvýšenou produkci L-lysinu při limitované biosyntéze jiných aminokyselin. Takové kmeny se jeví jako vhodný model pro další studium mutageneze s cílem připravit nové vysokoprodukční producenty L-lysinu.

#### Literatura

- [1] SMÉKAL, ULBERT, BÁRTA: Kvas. prům., **31**, 1985, s. 282.
- [2] KONÍČKOVÁ-RADOCHOVÁ, KONÍČEK, RYTÍŘ: Fol. Microbiol., **28**, 1983, s. 268.
- [3] BULANT, BULANTOVÁ, SMÉKAL: Proceed. „Heyrovsky Memorial Congress on Polarography“, Part II, Praha 1980, s. 26.
- [4] PELECHOVÁ, SMÉKAL, KOURA, KRUMPHANZL: Fol. Microbiol., **25**, 1980, s. 341.
- [5] ABE, KAKAYAMA: The Microbial Production of Amino Acid. Tokyo 1972.
- [6] NSR patent. spis č. 2 321 461, 1972.

**Koníčková-Radochová, M. - Smékal, F. - Koníček, J. - Rytíř, V.: Produkce aminokyselin u mutantních kmenů *Brevibacterium sp. M-27*.** Kvas. prům., **32**, 1986, č. 6, s. 134—135.

Byla studována mutageneze kmene *Brevibacterium sp. M-27* pomocí N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidinu s cílem připravit nové producenty L-lysinu a dalších aminokyselin. Výsledkem práce je soubor auxotrofních mutantních kmenů, pigmentovaných a auxotrofních pigmentovaných mutant. Byly získány suspektní producenti alaninu, valinu a kyseliny glutamové. Mezi mnohonásobně depedentními mutantami existují kmeny se zvýšenou produkcí L-lysinu.

**Коничкова-Радохова, М., Смекал, Ф., Коничек, И., Рытир, В.: Продукция аминокислот мутантными штаммами *Brevibacterium sp. M-27*.** Квас. прум. 32, 1986, № 6, стр. 134—135.

Изучался мутагенез штамма *Brevibacterium sp. M-27* при помощи N-метил-N'-нитро-N-нитросогуанидина с целью получить новые продуценты L-лизина и следующих аминокислот. Результатом работы является набор ауксотрофных мутантных штаммов, пигментированных и ауксотрофных пигментированных мутантов. Были получены подозрительные продуценты аланина, валина и глутамовой кислоты. Среди многократнодепендентными мутантами имеются штаммы с повышенной продукцией L-лизина.

**Koníčková-Radochová, M. - Smékal, F. - Koníček, J. Rytíř, V.: Amino Acids Production with Mutant Strains of *Brevibacterium sp. M-27*.** Kvas. prům. **32**, 1986, No. 6, pp. 134—135.

The mutation of the strain of *Brevibacterium sp. M-27* using N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine was studied with the aim to prepare new producers of L-lysine and further amino acids. The work results in a group of auxotroph mutant strains, pigmented and auxotroph pigmented mutants. There were obtained the suspected producers of alanine, valine and glutamine acid there. Among the many-fold dependent mutants, the strains with increased production on L-lysine exist.

**Koníčková-Radochová, M. - Smékal, F. - Koníček, J. - Rytíř, V.: Produktion der Aminosäuren bei Mutantstämmen *Brevibacterium sp. M-27*.** Kvas. prům. **32**, 1986, Nr. 6, S. 134—135.

Es wurde die Mutagenese des Stammes *Brevibacterium sp. M-27* mittels N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin studiert mit dem Ziel der Vorbereitung neuer Produzenten des L-lysin und weiterer Aminosäuren. Als Ergebnis der Arbeit wird eine Garnitur auxotrofer Mutantstämmme, pigmentierter und auxotrofer pigmentierter Mutanten präsentiert. Es wurden suspekte Alanin-, Valin- und Glutamsäure-Produzenten gewonnen. Unter den vielfach dependenten Mutanten existieren Stämme mit einer erhöhten L-Lysin-Produktion.