

# Příprava L-threoninu s mutantami rodu *Corynebacterium*

RNDr. JIŘÍ PLACHÝ, Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

663.2 579

**Klíčová slova:** *Corynebacterium*, mutanty rezistentní k analogu threoninu, fermentační příprava threoninu

Esenciální aminokyselinu threonin — stejně jako většinu aminokyselin vyskytujících se v bílkovinách — lze připravit přímo fermentací, tj. s použitím mikroorganismů kultivovaných v médiích optimálního složení za optimálních podmínek. Z producentů threoninu se osvědčily mutanty auxotrofní (Kase et al. 1971) a mutanty regulační, selektované jako mutanty rezistentní k analognu aminokyselin (Kase a Nakayama, 1972). Významná množství threoninu hromadily v prostředí mutanty koryneformních baktérií, především mutanty rodů *Corynebacterium* a *Brevibacterium*, rezistentní k analognu threoninu, tj. k  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxyvalerové kyselině (AHV) (Shio a Nakamori, 1970; Kase a Nakayama, 1972). U těchto mutant se projevila nadprodukce threoninu následkem snížené citlivosti dehydrogenasy homoserinu (EC 1.1.1.3) k inhibičnímu účinku threoninu (Shio a Nakamori, 1970). Tento enzym katalyzuje přeměnu semialdehydu asparagové kyseliny (intermediáru metabolismu asparagové kyseliny, z níž biosyntéza threoninu vychází) na homoserin, přímý prekurzor threoninu.

Cílem práce bylo ověřit v laboratorním měřítku možnost fermentační přípravy threoninu s použitím mutant rezistentních k analognu threoninu (AHV<sup>R</sup>-mutanty).

## MATERIÁL A METODY

**Mikroorganismus:** Jako výchozí organismus při izolaci mutant sloužil prototrofní kmen *Corynebacterium sp.* 9366 hromadící v médiu glutamovou kyselinu (Musílková et al., 1966).

**Chemikálie:** K indukci mutant byl použit ethylmethansulfonát fy Koch and Light. Analog threoninu- $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxyvalerová kyselina — byl připraven ve Výzkumném ústavu antibiotik a biotransformací, Praha.

**Média:** Při izolaci mutant bylo použito kompletní (KM) a minimální médium (MM) (Lederberg, 1950); izolované mutanty byly produkčně hodnoceny v médiu TP tohoto složení [%]: glukosa — 10, kukuřičný výluh (65 % sušiny) — 2,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  — 3,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 1,5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,04,  $\text{CaCO}_3$  — 5; pH — 7,0 — 7,2. Při ověřování možnosti fermentační přípravy threoninu s vybranou mutantou bylo jako inkubační médium užito médium CSL-B, obsahující (v %) glukosu — 2 a kukuřičný výluh (65 % sušiny) — 1,5 (pH 7) a jako produkční médium TP-1, v němž glukosa byla nahrazena 10 % sacharosy. Většina médií byla sterilována při 120 °C 30 min.

**Izolace mutant:** Buněčné suspenze kmene *Corynebacterium sp.* 9366, vyrostlé za 18 h submerzní kultivace v KM, po promytí fosfátovým pufrem (pH 7,2) a vystavení působení mutagenu, se promlyly, nařídily a očkovaly na plotny s MM doplněným analogem. Kolonie rezistentních mutant, vyrostlé po 3 dnech při 28 °C na plotnách, byly vyočkovány na šikmé agary.

**Kultivace:** 500 ml varné baňky s 20 ml médiem TP byly očkovány mutantami vyrostlými na šikmých agarech. S vybranou mutantou byly 500 ml varné baňky s 20 ml médiem TP-1 očkovány inkolem, vyrostlým za 24 h, v médiu CSL-B. Zaočkované baňky se inkubovaly na rotační třepáčce (frekvence otáček — 3,7, výstředník — 25 mm) při 28 °C jednak 4 dny, při ověřování schopnosti mutant produkovat threonin, jednak 5 dní při sledování průběhu fermentace threoninu s vybranou mutantou.

**Analytické metody:** Růst se sledoval gravimetrickým stanovením sušiny. Přítomnost threoninu v kultivační tekutině se zjišťovala papírovou chromatografií, kvantitativně byl threonin stanoven modifikovanou polarografickou metodou, vyvinutou na základě Blockovy metody (Block, 1963). Spotřeba sacharidů se sledovala stanovením redukujících cukrů (Janíček a Hrdlička, 1954); pH se měřilo pH-metrem OP-205 (Radelkis, Maďarsko).

## VÝSLEDKY

Sledoval se inhibiční vliv různých koncentrací AHV na růst kmene *Corynebacterium sp.* 9366. Promytou a zředěnou buněčnou suspenzi, vyrostlou v KM, byly očkovány plotny s MM doplněným 10, 100 a 1000  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  AHV a relativní růst se stanovil po 3 dnech inkubace ploten při 28 °C. Růst kmene *Corynebacterium sp.* 9366 byl inhibován na 30 % v přítomnosti již 10  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  AHV, na 0,5 % při 100  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  a zcela při aplikaci 1000  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ .

Při izolaci AHV<sup>R</sup>-mutant kmene *Corynebacterium sp.* 9366 byla buněčná suspenze vystavena po dobu 18 h působení 0,05 M ethylmethansulfonátu (tato dáze se osvědčila jako optimální při izolaci různých typů mutant kmene *Corynebacterium sp.* 9366) a použita k očkování ploten s MM doplněných 100  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  AHV. O výsledcích izolace AHV<sup>R</sup>-mutant a jejich schopnosti hromadit v médiu threonin informuje tab. 1.

Tabulka 1. Izolace AHV<sup>R</sup>-mutant *Corynebacterium sp.* 9366 produkujících threonin

Počet otestovaných kolonií	1 114
Počet izolovaných mutant	56
Procento izolovaných mutant	5,03
R	
Počet AHV <sup>R</sup> -mutant produkujících threonin	12
R	
Procento AHV <sup>R</sup> -mutant produkujících threonin	21,43

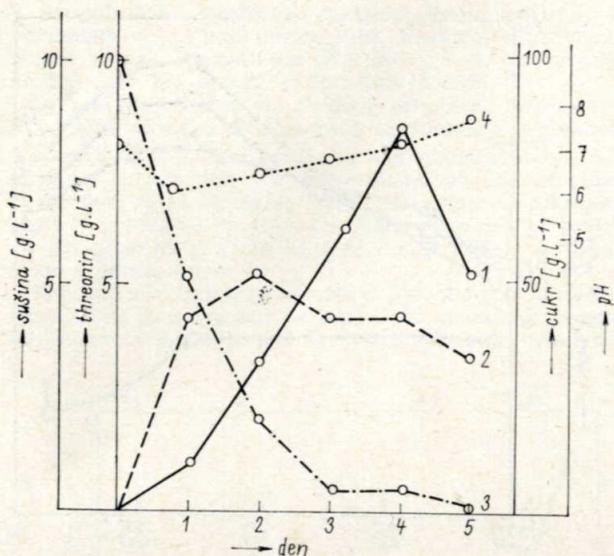
Z 1114 testovaných kolonií bylo izolováno 56 AHV<sup>R</sup>-mutant a u 12 z izolovaných mutant se zjistila schopnost hromadit v médiu threonin. Produkce threoninu dosahované jednotlivými mutantami kolísala v rozmezí 1–5  $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ; 67 % mutant hromadilo 1–2  $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  threoninu. Maximální produkce byla zaznamenána s mutantou *Corynebacterium sp.* 9366/AHV-21, která po 4 dnech kultivace dosáhla produkce 5,2  $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  threoninu.

S mutantou *Corynebacterium sp.* 9366/AHV-21 byl vypracován v laboratorním měřítku fermentační postup přípravy threoninu, při kterém se produkční mutanta kultivovala 5 dní v médiu TP-1, zaočkovaném 10 % (obj.) inkolu vyrostlého za 24 h. Průběh kultivace mutanty je znázorněn v grafu 1.

Po dosažení maxima nárůstu 2. dne kultivace bylo zaznamenáno maximum produkce 4. dne (7,5  $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  threoninu). Cukr byl v průběhu fermentace rychle spotřebován, zvláště od 0. do 72. hodiny kultivace; pH po počátečním poklesu mělo vzestupnou tendenci, dosahujíc 5. dne kultivace hodnoty 7,8.

## DISKUSE

Citlivost kmene *Corynebacterium sp.* 9366 k inhibičnímu účinku  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxyvalerové kyseliny byla značná — růst byl inhibován až na 30 % již aplikací 10  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  AHV, zatímco téhož stupně inhibice se dosáhlo s kmenem *Brevibacterium flavum* až při koncentraci 380  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  (Shio a Nakamori, 1970). Ve srovnání s výsledky, které uvádějí Kase a Nakayama (1972), představovalo procento AHV<sup>R</sup>-mutant produkujících threonin (21 %) asi jen polovinu hodnoty dosažené japonskými autory. Z mutant produkujících threonin byly nejvíce zastoupeny mutanty produkující 1–2  $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$  threoninu — k podobným výsledkům dospěli také Kase a Nakayama (1972). S vybranou mutantou *Corynebacterium sp.* 9366-AHV/21 byl vypracován v laboratorním měřítku fermentační postup přípravy threoninu. Stejně jako u jiných mutant kmene *Corynebacterium sp.* 9366



Obr. 1. Průběh fermentace threoninu

křivka 1 — threonin ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ), křivka 2 — sušina ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  
křivka 3 — cukr ( $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ ), 4 — pH.

produkujících aminokyseliny (Plachý, 1970, 1975) byly u mutantů hromadící threonin zaznamenána stimulační účinky sacharosy na výši produkce threoninu. V médiu TP-1, zaočkováném inkolem mutantu *Corynebacterium sp. 9366-AHV/21*, se dosáhlo 4. dne kultivace produkce  $7.5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  threoninu.

**Poděkování:** Autor děkuje J. Hroudové a J. Křivánkové za technickou pomoc.

#### Literatura

- [1] BLOCK, R. J.: In: P. ALEXANDER, J. R. BLOCK (eds.): *A laboratory manual of analytical methods of protein chemistry*. (In Russian), Izdatelstvo inostrannoy literatury, Moskva, 1963, s. 504.
- [2] JANÍČEK, G. - HRDLIČKA, J.: Listy cukrovarnické **70**, 1954, s. 27.
- [3] KASE, H. - TANAKA, H. - NAKAYAMA, K.: Agric. Biol. Chem. **35**, 1971, s. 2089.

- [4] KASE, H. - NAKAYAMA, K.: Agric. Biol. Chem. **36**, 1972, s. 1611.
- [5] LEDERBERG, J.: Methods Med. Res. **3**, 1950, s. 5.
- [6] MUSÍLKOVÁ, M. - NEČÁSEK, J. - PLACHÝ, J. - LOKVENC, F. - ČERKES, L.: Folia Microbiol. **11**, 1966, s. 301.
- [7] PLACHÝ, J.: Folia Microbiol. **15**, 1970, s. 347.
- [8] PLACHÝ, J.: Folia Microbiol. **20**, 1975, s. 346.
- [9] SHIO, I. - NAKAMORI, S.: Agric. Biol. Chem. **34**, 1970, s. 448.

**Plachý, J.: Příprava L-threoninu s mutantami rodu *Corynebacterium*.** Kvás. prům. **32**, 1986, č. 7—8, s. 182—183.

Z mutant rodu *Corynebacterium* rezistentních k  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxyvalerové kyselině a produkovacích threonin byla vybrána mutanta *Corynebacterium sp. 9366-AHV/21* hromadící v médiu se sacharosou a kukuřičným výluhem po 4 dnech kultivace v baňkách  $7.5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  L-threoninu.

**Плахи, Ю.: Приготовление L-треонина с мутантами *Corynebacterium*.** Квас. прум. **32**, 1986, № 7—8, стр. 182—183.

Из мутантов *Corynebacterium* устойчивых  $\beta$ -окси-норвалину и образующих треонин был выбран мутант *Corynebacterium sp. 9366-AHV/21* накапливающий в среде со сахарозой и кукурузным экстрактом после 4 суток культивации в колбах  $7.5 \text{ г} \cdot \text{l}^{-1}$  L-треонина.

**Plachý, J.: Preparation of Lysine by Mutants of *Corynebacterium*.** Kvás. prům. **32**, 1986, No. 7—8, pp. 182—183.

From  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxyvaleric acid resistant mutants of *Corynebacterium* producing threonine there was selected the mutant *Corynebacterium sp. 9366-AHV/21*, capable of accumulating  $7.5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  L-Threonine in a saccharose — corn-steep medium after 4 days of cultivation in flasks.

**Plachý, J.: Die Herstellung von Threonin mit Mutanten von *Corynebacterium*.** Kvás. prům., **32**, 1986, č. 7—8, S. 182—183.

Die Mutante *Corynebacterium sp. 9366-AHV/21* wurde von den gegenüber  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -hydroxyvaleriansäure resistenten Mutanten und produzierten Threonin ausgewählt. Diesen Mutante hat  $7.5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  L-Threonin in einem Medium mit Saccharose und Maisquellwasser nach 4 Tagen Kultivation in Kolben akkumuliert.