

Regulace biosyntézy L-lysinu u chromogenních mutant *Brevibacterium species M-27*

579 663

RNDr. FRANTIŠEK SMĚKAL, CSc., Ing. HANA RYŠANOVÁ, Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Rostoky u Prahy

RNDr. MILUŠE KONÍČKOVÁ-RADOCHOVÁ, CSc., MUDr. JIŘÍ KONÍČEK, DrSc., Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha

Klíčová slova: *Brevibacterium species*, chromogenní mutanty, biosyntéza, L-lysin, regulace, konverze

Významnou skupinou bakteriálních kmenů, které produkují L-lysin, jsou brevibakterie. Pro auxotrofně-regulační mutanty *Brevibacterium flavum* a *Brevibacterium species* je charakteristická značná variabilita v pigmentaci buněk. Působením některých mutagenních látek, např. N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidinem nebo UV-zářením byly u kmene *Brevibacterium species M-27* připraveny různé typy pigmentových mutant s výraznou oranžovou, růžovou a béžovou barvou kolonií; rodičovský kmen *Brevibacterium species M-27* se vyznačuje světle žlutou pigmentací. Změna v pigmentaci chromogenních mutant je stabilním fenotypovým znakem [1]. U auxotrofně-regulačních mutant *Corynebacterium glutamicum* nebo *Corynebacterium species* nejsou změny v pigmentaci tak výrazné jako u uvedených skupiny brevibakterií. Sledování biosyntézy L-lysinu u *Corynebacterium glutamicum* ukázalo, že hlavními faktory v regulaci biosyntézy L-lysinu jsou optimální poměry rychlostí utilizace zdrojů uhlíku a dusíku v průběhu počátečních fází kultivace [2]. V této práci jsou sledovány některé parametry regulace biosyntézy L-lysinu u chromogenních mutant *Brevibacterium species M-27*.

MATERIÁL A METODY

V práci byly použity tyto produkční kmeny: *Brevibacterium sp. M-27* (rodičovský kmen), dále mutanty *Brevibacterium sp. M-27-28* (oranžová pigmentace), *Brevibacterium sp. M-27-34* (růžová pigmentace) a *Brevibacterium sp. M-27-4* (béžová barva kolonií). Kmeny se pasážují na MPA agarech. Složení inokulačního média a fermentačních médií bylo popsáno v práci [3]. Způsob kultivace, dále metody stanovení L-lysinu, biomasy a redukujících látek jsou uvedeny v dřívějších publikacích [4, 5].

VÝSLEDKY A DISKUSE

Některé fyziologické parametry biosyntézy L-lysinu byly u chromogenních mutant *Brevibacterium species* sledovány na standardních fermentačních médiích s odlišnými koncentracemi zdroje dusíku (s 10 % obj. hydrolyzátu arašídové mouky — médium I a se 14 % obj. arašídové mouky — médium II) při shodném obsahu 10 % hmot. sacharosu v obou typech médií. Sledováním rychlosti utilizace sacharosu v průběhu 24 hodin kultivace bylo u chromogenních mutant zjištěno značné snížení rychlosti spotřeby sacharosu, a to o 50 až 80 % proti stejným hodnotám u rodičovského kmene *Brevibacterium species M-27*. Snížená rychlost utilizace sacharosu se dále projevila jako regulační faktor růstu při dosažení vysokých hodnot konverze mezi 43 až 63 % u mutantních kmenů; u rodičovského kmene činí konverze pouze 25 %. Při sledování stejných parametrů u mutantních kmenů na fermentačním médiu II s vyšším obsahem komplexního zdroje dusíku je spotřeba sacharosu vyšší

a představuje 60 až 80 % spotřeby sacharosu rodičovského kmene *Brevibacterium species M-27*; to ovlivňuje jak rychlost růstu kultur, tak především má negativní vliv na hodnoty konverze, které se pohybují mezi 29 až 33 %. K relativnímu snížení konverze dochází i u rodičovského kmene s hodnotami 18 až 25 %. Produkce L-lysinu ve 24. hodině fermentace, rychlost utilizace sacharosu, tvorba biomasy a konverze uhlíkatého zdroje na fermentačních médiích I a II jsou shrnuty v tabulkách I a 2.

Hodnoty rychlostí spotřeby sacharosu udávané v tabulkách (mg sacharosu . ml⁻¹ . h⁻¹) ukazují na značný rozdíl mezi spotřebami u rodičovského kmene *Brevibacterium species M-27* a chromogenními mutantami jako celku a další diference mezi jednotlivými kmeny. Tento regulační faktor ovlivňuje tvorbu biomasy a významně zasahuje dále činitelem ovlivňující stupeň konverze uhlíka-

Tabulka 1. Produkce L-lysinu, rychlost spotřeby sacharosu, tvorba biomasy a konverze ve 24. hodině fermentace u chromogenních mutant *Brevibacterium species M-27* na fermentačním médiu I s 10% obj. zdroje dusíku

Mutanta <i>Brevibacterium species</i>	Rychlost spotřeby sacharosu (mg . ml ⁻¹ . h ⁻¹)	Biomasa (% obj.)	Produkce L-lysinu (mg . ml ⁻¹)	Konverze (%)
M-27	2,6	15	15	25
M-27-28	1,1	13	12	40
M-27-34	1,0	10	12	48
M-27-4	0,6	12	11	63

Tabulka 2. Produkce L-lysinu, rychlost spotřeby sacharosu, tvorba biomasy a konverze ve 24. hodině kultivace u chromogenních mutant *Brevibacterium species M-27* na fermentačním médiu II se 14% obj. zdroje dusíku

Mutanta <i>Brevibacterium species</i>	Rychlost spotřeby sacharosu (mg . ml ⁻¹ . h ⁻¹)	Biomasa (% obj.)	Produkce L-lysinu (mg . ml ⁻¹)	Konverze (%)
M-27	2,5	15	11	18
M-27-28	1,7	13	11	29
M-27-34	1,6	14	12	31
M-27-4	1,5	13	13	33

tého zdroje na L-lysin. Zvláště u mutant M-27-34 a M-27-4 je na fermentačním médiu I dosahováno optimálních rychlostí utilizace sacharosu při relativně nízké tvorbě biomasy a vysoké konverzi s hodnotami 48 až 63 %. Naopak na fermentačním médiu II s vyšším obsahem dusíku se zvyšuje rychlost utilizace sacharosu při snížení konverze u obou mutantních kmenů na 31 až 33 %.

Zjištěné rozdíly ve fyziologických parametrech biosyntézy L-lysinu u *Brevibacterium species* M-27 a sledovaného mutant značně ovlivňují průběh fermentace, jak v celkové produkci aminokyseliny, tak i hodnotách konverze po 96 hodinách kultivace. U kontrolního rodičovského kmene se na obou typech fermentačních médií dosahuje produkci L-lysinu kolem $32 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ s konverzí 32 %, zatímco u chromogenních mutant M-27-34 a M-27-4 dochází ke zvýšení produkce L-lysinu na 43 až $49 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ a tomu odpovídající vysoké konverzi 43 až 49 %. Pro mutantu M-27-28 s oranžovým pigmentem jsou charakteristické rozdíly v produkci L-lysinu: na fermentačním médiu I se dosahuje produkce L-lysinu $38 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ a na médiu II vysokých produkci $47 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Souhrnné výsledky uvádějící produkci L-lysinu a konverzi u chromogenních mutant *Brevibacterium species* M-27 jsou uvedeny v tabulkách 3 a 4. Zjištěné výsledky regulace biosyntézy L-lysinu u chromogenních mutant *Brevibacterium species* M-27 ukazují na podobný mechanismus regulace biosyntézy jako u auxotrofně-regulačních mutant *Corynebacterium glutamicum*.

Tabulka 3. Produkce L-lysinu a hodnoty konverze uhlíkatého zdroje u chromogenních mutant *Brevibacterium species* M-27 na fermentačním médiu s 10% obj. zdroje dusíku po 96 hodinách fermentace

Mutanta <i>Brevibacterium species</i>	Produkce L-lysinu ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Konverze (%)
M-27	32,0	32
M-27-28	38,6	38
M-27-34	43,5	43
M-27-4	45,5	45

Tabulka 4. Produkce L-lysinu a hodnoty konverze uhlíkatého zdroje u chromogenních mutant *Brevibacterium species* M-27 na fermentačním médiu se 14% obj. zdroje dusíku po 96 hodinách fermentace

Mutanta <i>Brevibacterium species</i>	Produkce L-lysinu ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Konverze (%)
M-27	32,5	32
M-27-28	47,5	47
M-27-34	43,5	43
M-27-4	49,0	49

Literatura

- [1] KONÍČKOVÁ, M., KONÍČEK, J., SMÉKAL, F., RYTÍŘ, V.: Kvas. prům., **32**, 1986, s. 134
- [2] SMÉKAL, F., PLACHÝ, J., ULBERT, S., BÁRTA, M.: Kvas. prům., **32**, 1986, s. 180
- [3] SMÉKAL, F., ULBERT, S., BÁRTA, M.: Kvas. prům., **31**, 1985, s. 282
- [4] BULANT, V., BULANTOVÁ, H., SMÉKAL, F.: Proceed. „Heyrovsky Memorial Congress on Polarography“, Part II, Praha 1980, s. 26
- [5] SMÉKAL, F., BÁRTA, M., BULANT, V., ULBERT, S.: Kvas. prům., **30**, 1984, s. 133

Lektoroval dr. Jiří Plachý, CSc.

Smékal, F. - Ryšánová, H. - Koníčková-Radochová, M. - Koníček, J.: Regulace biosyntézy L-lysinu u chromogenních mutant *Brevibacterium species* M-27. Kvas. prům., **34**, 1988, č. 6, s. 172—173.

Základními faktory regulace biosyntézy L-lysinu u chromogenních mutant *Brevibacterium species* jsou rychlosti utilizace uhlíkatého zdroje a množství zdroje dusíku ve fermentačním médiu. Optimalizací procesu fermentace se dosahuje produkci L-lysinu mezi 43 až $49 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ za 96 hodin kultivace s konverzí 45 až 49 %.

Смекал, Ф. - Рышанова, Г. - Коничкова-Радочова, М. - Коничек, И.: Регулирование биосинтеза L-лизина для хромогенных мутантов *Brevibacterium species*. Квас. прум., **34**, 1988, № 6, стр. 172—173.

Основными факторами регулирования биосинтеза L-лизина для хромогенных мутантов *Brevibacterium species* являются скорость потребления углеродистого источника и количества источника азота в ферментационной среде. Путем оптимизации процесса ферментации достигается выхода L-лизина 43—49 г. л⁻¹ при 96 часах культивирования с конверсией 45—49 %.

Smékal, F. - Ryšánová, H. - Koníčková-Radochová, M. - Koníček, J.: Control of L-Lysine Biosynthesis with Chromogene Mutants of *Brevibacterium species* M-27. Kvas. prům., **34**, 1988, No. 6, pp. 172—173.

Principal factors of the control of L-lysine biosynthesis, with chromogene mutants of *Brevibacterium species*, are the rates of carbon source utilization and the quantity of nitrogen source in the fermentation medium. After an optimization of the fermentation process the L-lysine production in a range of 43 to $49 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ in 96 hours with the conversion of 45 to 49 % can be achieved.

Smékal, F. - Ryšánová, H. - Koníčková-Radochová, M. - Koníček, J.: Regulation der Biosynthese des L-Lysins bei chromogenen Mutanten *Brevibacterium species* M-27. Kvas. prům., **34**, 1988, Nr. 6, S. 172—173.

Die Grundfaktoren der Regulation der Biosynthese des L-Lysins bei chromogenen Mutanten *Brevibacterium species* sind die Geschwindigkeiten der Utilisation der Kohlenstoffquelle und die Menge der Stickstoffquelle in dem Fermentationsmedium. Durch Optimierung des Fermentationsprozesses werden Produktionsparameter des L-Lysins zwischen 43 bis $49 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ während 96 Stunden der Kultivierung mit Konversion 45—49 % erreicht.