

## Príprava mutantov kvasinky *Candida lipolytica* 106, hyperproducentov kyseliny citrónovej na *n*-alkánoch

BOHUMIL ŠKÁRKA - LIANA UJHELYIOVÁ

**Súhrn.** Použitím ultrafialového žiarenia s prídavkom fluóracetátu a jódacetátu, resp. použitím nitrózoguanidínu sme pripravili mutanty kvasinky *Candida lipolytica* 106, ktoré vykazovali zvýšenú produkciu kyseliny citrónovej až o 54 % a kyseliny izocitrónovej až o 40 %, oboch kyselín až o 35 %. Tieto mutanty si pri opakovanom preočkovaní počas 2 mesiacov v pokusoch na trepačke zachovali prakticky rovnakú produkciu.

Ekonomicky výhodná fermentačná výroba kyseliny citrónovej predpokladá využitie producenta s čo najvyššou produkciou tejto kyseliny. Kmene mikroorganizmov izolované z prírody obvykle nevykazujú mimoriadne vysokú produkciu kyseliny citrónovej. Preto sa hľadá riešenie prípravou mutantov pomocou fyzikálnych a chemických mutagénov [1, 2].

V práci sme sa zaoberali prípravou mutantov kvasinky *Candida lipolytica* 106, použitím ultrafialového žiarenia a nitrózoguanidínu. Získané mutanty vykazovali v pokusoch na trepačke dva mesiace vysokú stabilitu produkcie kyseliny citrónovej a izocitrónovej.

### Materiál a metódy

**Použitý mikroorganizmus.** Použili sme kvasinku *Candida lipolytica* 106 zo zbierky mikroorganizmov VÚRUP v Bratislave.

**Podmienky kultivácie.** Kultivovali sme na rotačnej trepačke (excenter 5 cm, 110 obr. min<sup>-1</sup>) v 50 ml pôdy 1 v 500 ml bankách s 2,5 ml inokula, pH 5,5, 28 °C. Na neutralizáciu vznikajúcich kyselín sme do každej banky pridali 3 g CaCO<sub>3</sub>.

---

Doc. Ing. Bohumil Škárka, DrSc., Ing. Liana Ujhelyiová, CSc., Katedra technickej mikrobiológie a biochémie, Chemickotechnologická fakulta SVŠT, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

*Kultivačné pôdy.* Pri práci sme používali rôzne kultivačné pôdy, ktoré sme označili číslami:

Pôda 1: močovina (1,1 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,5 g), kukuričný výluh (0,8 g), vodovodná voda (1 l), *n*-alkány (80 ml.l<sup>-1</sup>) [5].

Pôda 2: glukóza (50,0 g), peptón (5,0 g), kvasničný extrakt (3,0 g), sladinka (3,0 g), destilovaná voda (1 l) [3].

Pôda 3: ako pôda 2, agar (25 g.l<sup>-1</sup>).

Pôda 4: glukóza (10,0 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,5 g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2 g),  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0,25 g),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2,0 g),  $\text{NaHCO}_3$  (1,0 g), kvasničný extrakt (0,5 g), destilovaná voda (1 l) [3].

Pôda 5: ako pôda 1; agar (25 g.l<sup>-1</sup>).

Pôda 6: ako pôda 1, brómkrezolová zeleň (4 g.l<sup>-1</sup>, 80 ml), agar (25 g.l<sup>-1</sup>) [6].

*Príprava mutantov.* a) Pomocou ultrafialového žiarenia [1, 3, 4]: Suspenziu buniek  $10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$  sme ožiarovali 300 s pod zdrojom ultrafialového žiarenia (Philips TUV, 30 W,  $2000 \text{ erg} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) zo vzdialenosti 40 cm. Ožiarené bunky sme kultivovali 6 dní na reciprokej trepačke pri 28 °C na pôde 2 s prídavkom fluóracetátu sodného (0,2 mol.l<sup>-1</sup>), resp. jódacetátu sodného (0,5 mol.l<sup>-1</sup>). Po skončení kultivácie sme po zriedení kultúru naniesli na testovaciu pôdu 3 a nechali inkubovať 48 h pri 28 °C. Vyrastené kolónie sme pečiatkovou metódou preniesli na pôdu 4 s fluóracetátom alebo jódacetátom sodným (inhibitory *cis*-akonitázy) a inkubovali opäť 48 h pri 28 °C. Vyrastené kultúry sme preočkovali na šikmý agar s pôdou 1 a udržiavali mesiac v tme.

b) Pomocou nitrózoguanidínu [2]: Suspenziu buniek  $10^7 \text{ ml}^{-1}$  v citrátovom tlmivom roztoku pH 5,5 po pridaní 200  $\mu\text{l}$  roztoku *N*-metyl-*N*-nitro-*N*-nitrózoguanidínu (1 mg.ml<sup>-1</sup>) sme inkubovali 2 h pri 30 °C na reciprokej trepačke. Po inkubácii sme bunky premyli, preniesli do 10 ml pôdy 1 a kultivovali 48 h pri 28 °C na reciprokej trepačke. Z pomnoženej kultúry sme urobili rozter na pôdu 5. Vyrastené kolónie sme preniesli pečiatkovou metódou na pôdu 6. Kolónie so žltou sfarbenými zónami, indikujúcimi produkciu kyselín, sme preočkovali na šikmé agary s pôdou 1.

*Stanovenie biomasy.* Biomasu sme stanovili gravimetricky po vysušení premytej biomasy pri 105 °C do konštantnej hmotnosti.

*Stanovenie kyseliny citrónovej a izocitrónovej.* Obidve sledované karboxylové kyseliny sme stanovili kapilárnou izotachoforézou, metódou podľa Madajovej a kol. [7].

## Výsledky a diskusia

Pri mutagenéze pomocou ultrafialového žiarenia a prídavku fluóracetátu sodného sme izolovali 105 kultúr. Z nich 82 rástlo na *n*-alkánoch a z toho 35 produkovalo kyselinu citrónovú a izocitrónovú.

Pri kultúrach (FAC 1–10) sme zistili produkciu kyseliny citrónovej 39–56 g.l<sup>-1</sup> (pri kontrole 46,6 g.l<sup>-1</sup>) (tab. 1) a kyseliny izocitrónovej 22–48 g.l<sup>-1</sup> (pri kontrole 34,5 g.l<sup>-1</sup>). Z výsledkov vidieť, že 6 mutantov dáva vyššie výťažky oboch kyselín ako základný kmeň. Najvyššiu produkciu mal mutant FAC 7 (122 %).

Za použitia ultrafialového žiarenia a jódacetátu sodného sme získali 76 kul-

Tabuľka 1. Produkcia kyseliny citrónovej a izocitrónovej mutantmi kmeňa *Candida lipolytica* 106 na 10. deň kultivácie na *n*-alkánoch (80 ml.l<sup>-1</sup>)

Table 1. Production of citric and isocitric acids by mutants of yeast strain *Candida lipolytica* 106 at *n*-alkanes on the 10th day of cultivation

Mutant <sup>1</sup>	Biomasa <sup>2</sup> [g.l <sup>-1</sup> ]	Kyselina citrónová <sup>3</sup>		Kyselina izocitrónová <sup>4</sup>		Kyselina citrónová a izocitrónová <sup>5</sup>	
		[g.l <sup>-1</sup> ]	[%]	[g.l <sup>-1</sup> ]	[%]	[g.l <sup>-1</sup> ]	[%]
Kontrola <sup>6</sup>	11,6	46,6	100,0	34,5	100,0	81,0	100,0
FAC 4	10,0	44,3	95,0	37,5	108,6	81,8	100,9
FAC 8	14,3	56,1	120,3	29,3	84,9	85,4	105,4
FAC 6	11,7	45,0	96,5	42,4	122,8	87,4	107,9
FAC 5	10,8	47,5	101,9	40,4	117,1	87,9	108,5
FAC 9	14,7	51,6	110,7	37,2	107,8	88,8	109,6
FAC 7	13,6	51,2	109,8	48,3	140,0	99,5	122,8
Kontrola <sup>6</sup>	9,3	52,3	100,0	32,6	100,0	84,9	100,0
JAC 8	8,9	49,3	94,2	34,3	105,2	83,6	98,5
JAC 5	9,2	55,1	105,3	32,9	100,9	88,0	103,6
JAC 7	9,0	54,4	104,0	33,7	103,3	88,1	103,8
JAC 11	9,7	54,6	104,3	35,0	107,3	89,6	105,5
JAC 6	9,7	59,3	113,3	33,0	101,2	92,3	108,7
JAC 2	9,0	58,3	111,4	34,6	106,1	92,9	109,4
JAC 14	11,4	64,6	123,5	35,1	107,7	99,7	117,4
JAC 12	12,1	67,2	128,4	37,0	113,5	104,2	122,7
JAC 15	9,9	67,4	128,8	38,0	116,6	105,4	124,1
Kontrola <sup>6</sup>	10,2	43,2	100,0	31,5	100,0	74,7	100,0
NG 5	11,4	31,0	71,7	35,0	111,1	66,0	88,3
NG 7	11,9	35,9	83,1	36,3	115,2	72,2	96,6
NG 2	11,6	51,3	118,7	29,2	92,7	79,5	106,4
NG 8	12,7	66,7	154,4	34,5	109,5	101,2	135,5

Výsledky stanovení sú priemery 3 paraleliiek, pričom smerodajná odchýlka neprevyšuje 1,2 %.

The results of evaluations are the mean values of 3 parallel ones, whereby the standard deviation is no more than 1.2%.

<sup>1</sup>Mutant; <sup>2</sup>Biomass; <sup>3</sup>Citric acid; <sup>4</sup>Isocitric acid; <sup>5</sup>Citric and isocitric acids; <sup>6</sup>Control.

túr. Z nich 15 produkovalo 49–67 g.l<sup>-1</sup> kyseliny citrónovej (pri kontrole 52, g.l<sup>-1</sup>) a 32–38 g.l<sup>-1</sup> kyseliny izocitrónovej (pri kontrole 32,6 g.l<sup>-1</sup>). Z výsledkov vidieť, že 8 z 15 mutantov (JAC 1–15) prevyšuje kontrolu produkciou kyseliny citrónovej a izocitrónovej. Najlepší bol mutant JAC 15 s produkciou o 24 % vyššou ako kontrola.

Za použitia nitrózoguanidínu sme pripravili 10 mutantov (NG 1–10), z ktorých 4 produkovali 31–66 g.l<sup>-1</sup> kyseliny citrónovej (kontrola 43,7 g.l<sup>-1</sup>) a 29–31 g.l<sup>-1</sup> kyseliny izocitrónovej (kontrola 31,5 g.l<sup>-1</sup>). Z nich 2 mutanty prevyšujú kontrolu produkciou oboch kyselín, mutant NG 8 až o 35 % (pozri tab. 1).

Údaje v tabuľke 1 umožňujú pozorovať rozmanitosť mutantov aj z hľadiska pomeru produkcie kyseliny citrónovej a izocitrónovej. Napríklad mutant FAC 6 produkuje o 3,5 % menej kyseliny citrónovej ako kontrola, ale o 212,8 % viac kyseliny izocitrónovej a naopak, mutant FAC 8 o 20,3 % viac kyseliny citrónovej, ale o 15,1 % menej kyseliny izocitrónovej ako kontroly. Podobne je to aj pri mutantoch JAC 8, NG 7 a NG 5, ktoré produkujú menej kyseliny citrónovej, ale viac kyseliny izocitrónovej ako kontroly.

Často sa na porovnanie produkčných schopností mutantov udáva stupeň konverzie substrátu. Tieto údaje o mutantoch, ktoré sme pripravili, sú v tabuľke 2.

Pri hodnotení mutantov má mimoriadny význam ich stabilita. Na zistenie stability našich mutantov sme po dvoch mesiacoch po opakovanom preočkovaní znovu stanovili ich schopnosť produkovať kyselinu citrónovú a izocitrónovú, pričom pri kultivácii na trepačke sme zaznamenali iba nevýznamné rozdiely oproti pôvodným pokusom. Z toho vyplýva, že vypracované metódy prípravy mutantov umožňujú získať stabilné mutanty.

Tabuľka 2. Porovnanie konverzie *n*-alkánov na kyselinu citrónovú a izocitrónovú najproduktívnejšími mutantmi kmeňa *Candida lipolytica* 106 na 10. deň kultivácie na *n*-alkánoch (80 ml.l<sup>-1</sup>).  
Table 2. The comparison of *n*-alkanes conversion to citric and isocitric acids using the most productive mutants of the strain *Candida lipolytica* 106 at *n*-alkanes on the 10th day of cultivation.

Mutant <sup>1</sup>	Produkcia kyseliny citrónovej a izocitrónovej <sup>2</sup> [g.l <sup>-1</sup> ]	Konverzia <i>n</i> -alkánov <sup>3</sup> [%]
Kontrola <sup>4</sup>	81,0	135,0
FAC 9	88,8	148,0
FAC 7	99,5	165,8
Kontrola <sup>4</sup>	84,9	141,5
JAC 14	99,7	166,1
JAC 12	104,2	173,6
JAC 15	105,4	175,6
Kontrola <sup>4</sup>	74,7	124,5
NG 8	101,2	168,6

<sup>1</sup>Mutant; <sup>2</sup>Production of citric and isocitric acids; <sup>3</sup>Conversion of *n*-alkanes; <sup>4</sup>Control.

## Literatúra

- [1] FINOGENOVA, T. V. – LOZINOV, A. B. – KARKLINS, P. – PELCMANE, I. – IL-LARIONOVA, V. I. – SHISHKANOVA, N. V., Biosintez oksikislot ketokislot mikroorganizmami. Riga, Zinate, 1983, s. 18.
- [2] GAILLARDIN, C. M. – CHAROY, V. – HESLOT, H., Arch. Microbiol., 92, 1973, s. 69.
- [3] Pat. NSR 2264763.
- [4] LVOVA, E. B., Mikrobiologija, 49, 1980, č. 2, s. 323.
- [5] MADAJOVÁ, V. – KANIANSKY, D. – RADĚJ, Z. – ESZÉNYIOVÁ, A., In: Zborník XXV. konferencie o rope, Slovnaft, Bratislava, 1980, s. 18.
- [6] MILLER, J. H.: Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, 1972, s. 116.
- [7] ŠKÁRKA, B.: Selekcia mikroorganizmov produkujúcich kyselinu citrónovú na n-alkánoch. Bratislava, SVŠT 1976.

### **Приготовление мутантов дрожжей *Candida lipolytica* 106 – гиперпродуцентов лимонной кислоты на *n*-алканах**

#### Резюме

При помощи использования Уф-лучей с добавкой фтор- и иодацетата или же нитрозогуанидина были приготовлены мутанты дрожжей *Candida lipolytica* 106 с повышенной продукцией лимонной кислоты на 54 %, и изолимонной кислоты на 40 %, вместе кислот на 35 %. При повторительной инокуляции эти мутанты в течение двух месяцев сохранили в экспериментах в встряхиватели фактически одинаковую продукцию.

### **The yeast *Candida lipolytica* 106 and the preparation of its mutants-hyperproducers of citric acid on *n*-alkanes**

#### Summary

Mutants of the yeast *Candida lipolytica* 106 producing higher amounts of citric acid (by up to 54 %) and isocitric acid (by up to 40 %), and of both acids by up to 35 % were prepared using UV irradiation with the addition of iodoacetate and fluoroacetate, or using nitrosoguanidine. These mutants kept the same ability to produce the above acids after the reinoculation in both experiments in rotary shaker during 2 months.