



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

206910
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 21/04

(22) Přihlášeno 31 07 79
(21) (PV 5289-79)

(40) Zveřejněno 15 09 80

(45) Vydáno 01 07 84

(75)

Autor vynálezu

BĚLÍK EDUARD ing. CSc., KŘÍŠTAN VLADIMÍR ing.,
MARŠÁLEK JAROSLAV RNDr. a ŠUSTA SVATOPLUK, KOUŘIM

(54) Kmen mikroorganismu *Bacillus licheniformis* CCM 3403

Vynález se týká kmene mikroorganismu *Bacillus licheniformis* CCM 3403

Jak je známo, získává se submerzní kultivací vybraných produkčních kmenů mikroorganismu *Bacillus licheniformis* antibiotikem bacitracin, které se aplikuje převážně v kombinaci se zinkem jako tzv. zink-bacitracin (Zn-bacitracin). Bacitracin je jednou z mála antibiotických látek, která nezanechává prakticky žádná rezidua po aplikaci ve výživě a při prevenci chorob hospodářských zvířat. Z tohoto důvodu je po bacitracinu stále značná poptávka.

Bacitracin se získává kultivací vysokoprodukčních kmenů *B. licheniformis* v tekutých živných půdách se zdroji uhlíku, dusíku a minerálií, za submerzních podmínek.

Rozšíření výrobní kapacity bacitracinu je bez nákladných a časově náročných investic a bez zvýšených nároků na energii a suroviny téměř nemožné. Jednu z mála cest k tomuto cíli představuje vysokoprodukční kmen.

Takový kmen se podařilo získat ze spontánní mutanty výchozího kmene *B. licheniformis* M 342 (1976) interní sbírkové označení Výzkumného ústavu pro biofaktory a veterinární léčiva), izolované z produkčních tanků, vykazující maximální produkci bacitracinu 380 mj/ml po 46 hodinách kultivace. Zpětnou izolací kmene z produkčního

tanku byl získán izolát, který vykazoval maximální produkci 413 mj/ml a který byl podroben mutagennímu zásahu. Mutagenese byla provedena ozářením sporové suspenze kmene ultrafialovým světlem ze vzdálenosti 20 cm, dávkou 30 erg. mm.⁻².sec⁻¹. Sporová suspenze byla ozařována v řadě 0,40, 65, 80, 100 a 130 sec. Celkem bylo hodnoceno 306 izolátů. První stupeň hodnocení byl proveden kombinovanou metodou otiskování ploten s difuzním testováním antibiotik. V prvním stupni bylo vybráno 50 izolátů, ze kterých pak ve druhém stupni hodnocení bylo metodou kultivace na třepačkách vybráno 6 izolátů. Po dalších dvou stupních hodnocení byl vybrán izolát MUV 180-64, který vykazoval maximální produkční schopnost v mediu s arašidovou moukou 490 mj/ml.

Takto získaný izolát byl dále podroben přirozenému rozsevu na plotnách s chudou půdou (půda dle Waksmana č. 4). Celkem bylo hodnoceno 200 kolonií. Po hodnocení ve třech stupních byl vybrán kmen označený 180-64, který vykazoval v laboratorních podmínkách maximální produkci 580 mj/ml. Tento kmen byl testován v provozních podmínkách, kde dosahoval maximální produkci 560 mj/ml bacitracinu ve 32. hodině kultivace. To je produkce asi o 40 % vyšší, za dobu asi o 30 % kratší než u původního kmene, při stejné spotřebě

206910

surovin. Nový kmen *Bacillus licheniformis* byl uložen v Československé sbírce mikroorganismů při Univerzitě J. E. Purkyně v Brně, tř. Obránců míru 10, pod číslem CCM 3403.

Vlastnosti nového kmene jsou uvedeny v následující tabulce:

Sledovaná vlastnost	Původní kmen M 342/1976	Nový kmen CCM 3403
popis kolonií na masopeptonovém agaru	hladké, světlebéžové kolonie, matný vzhled, kulaté, nepravidelné okraje, velikost po 24 hod. 3 až 10 mm	běžové kolonie, střídající se hladký a zvrásněný povrch, kulaté, okraje nepravidelné, někdy až klkované výběžky, velikost po 24 hod. 4 až 12 mm
charakterná růsta v produkční půdě při submerzní kultivaci	po vyklíčení spor ná- růst vláknitý, rozpad vláken až na jednotlivé buňky a následovaná sporulace	pomalejší rozpad vláken až na jednotlivé buňky a následovaná sporulace
průměr vláknů	0,5 až 1 nm	0,8 až 1,5 nm
rozměry buňky po rozpadu vláken	0,5 až 0,9 krát 1,2 až 2 nm	0,8 až 1,5 krát 1,6 až 2,5 nm
popis spor	centrální, elipsovitého tvaru	centrální až excentricky uložené, elipsovitého tvaru
rozpad vláken	v 10. až 12. h kultivace	v 15. až 19. h kultivace
masová sporulace	po 40 až 48 h kultivace	po 30 až 34 h kultivace

Příklady provedení

Příklad 1

Produkční kmeny *Bacillus licheniformis* byly kultivovány v produkčních baňkách s obsahem 40 ml fermentační půdy tohoto složení (v % hmotn.)

arašidová mouka	4
sojová mouka	1
škrob	2
sacharosa	1
síran amonný	0,2
uhličitan vápenatý	1,25

Zaočkovaná půda byla kultivována na rotační třepačce při teplotě 35 °C. Původní kmen *B. licheniformis* M 342/1976 vykazoval maximum produkce 410 mj/ml bacitracinu ve 42. až 46. hodině kultivace, nový kmen *B. licheniformis* CCM 3403 vykázal maximum produkce 580 mj/ml bacitracinu ve 32. až 35. hodině kultivace.

Příklad 2

Na kultivačních půdách stejného složení jako v příkladu 1 byly provedeny srovnávací provozní kultivace ve fermentorech o obsahu 15 000 litrů, při plnění 11 000 litry fermentační půdy. Původní kmen vykázal maximum produkce 380 mj/ml ve 46. hodině kultivace, nový kmen vykázal maximum 560 mj/ml ve 32. hodině kultivace.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Kmen mikroorganismu *Bacillus licheniformis* CCM 3403 produkující bacitracin.