



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

260378

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 1/20

(22) Prihlášené 15 05 87
(21) (PV 3512-87.Z)

(40) Zverejnené 16 05 88

(45) Vydané 15 05 89

(75)

Autor vynálezu

KUZMOVÁ ELENA ing., SITKEY VLADIMÍR ing.,
MAJERČÍKOVÁ DANIELA dipl. tech., BRATISLAVA

(54) Kmeň mikroorganizmu *Bacillus cereus* CCM 3993

1

2

Kmeň *Bacillus cereus* CCM 3993 produkuje za definovaných podmienok vo zvýšenej miere proteolytický enzým neutrálnu proteínázu.

Charakteristickou črtou tohto kmeňa je, že z celkovej proteolytickej aktivity iba 3 % pripadajú na alkalickú proteínázu, ktorá je nežiadúcim vedľajším produktom a ťažko sa oddeľuje od neutrálnej proteínázy. Pri kultivácii kmeňa *Bacillus cereus* CCM 3993 na pôde komplexného zloženia sa dosahuje po 48 hodinách priemerná aktivita neutrálnej proteínázy 17 000 proteolytických jednotiek (1 ml).

Vynález sa týka nového kmeňa mikroorganizmu *Bacillus cereus* (Bacillaceae, Bacillus) CCM 3993, produkujúceho na kultivačných pôdach, obsahujúcich obvyklé zdroje C, N a P, vysoké množstvá neutrálnej proteínázy, s podielom alkalického proteínázy, neprevyšujúcim 3,0 % z celkovej proteolytickej aktivity.

Doteraz známy produkčný mikroorganizmus, používaný v ČSSR pri výrobe proteolytických enzýmov v JZD Slušovice, produkoval zmes alkalického a neutrálneho proteínázy s podielom alkalického proteínázy minimálne 15 %. Vzhľadom k tomu, že neutrálna proteínáza je v roztokoch enzýmovej zmesi neutrálneho a alkalického proteínázy relatívne nestabilná, čo je zapríčinené hlavne proteolýzou pomocou alkalického proteínázy, komerčné využitie takýchto zmesných preparátov naráža na určité ťažkosti. Rovnako obtiažnym je aj oddelenie neutrálneho proteínázy zo zmesi v prípade, že je potrebné komerčne využiť iba čistú neutrálnu proteínázu.

Uvedené nedostatky odstraňuje vynález, ktorým je nový kmeň mikroorganizmu *Bacillus cereus*, uložený v Čs. zbierke mikroorganizmov Univerzity J. E. Purkyně v Brne pod označením CCM 3993.

Hlavnou výhodou nového kmeňa je, že kmeň *Bacillus cereus* CCM 3993 podľa vyná-

lezu je schopný v opakovaných 48-hodinových fermentačných testoch na laboratórnej rotačnej trepačke pri 230 ot./min. a teplote 37 °C na kultivačnej pôde, so zložením: škrob 6 %, sójová múka 1 %, kazeín 0,5 %, hydrogénfosforečnan dvojamonný 0,5 %, chlorid vápenatý dihydrát 0,05 %, chlorid sodný 0,5 %, síran zinočnatý heptahydrát 0,1 %, pH 7,0, produkovať neutrálnu proteínázu pri hladinách aktivity v priemere 17 000 PU/1 ml s podielom alkalického proteínázy, neprevyšujúcim 3 % z celkovej proteolytickej aktivity.

Kmeň *Bacillus cereus* CCM 3993 morfológicky predstavuje grampozitívne tyčinky, vyskytujúce sa v reťazkách. Tvorí oválne, centrálné spóry, bunku nezdurujúce. Na MPA tvorí mierne vypuklé kolónie voskovej farby s vyvýšeným stredom, matné, jemne zrnité, okraj rovný. Pozitívne reakcie: kataláza, anaeróbny rast, Egg-yolk, acetoin, fosfatáza, nitráty, glycerol, sacharóza, trehalóza, hydrolýza želatíny. Negatívne reakcie: ureáza, manitol, eskulín, Tween 80.

Hodnoty proteolytickej aktivity, dosiahnuté na kultivačnej pôde uvedeného zloženia a za uvedených fermentačných podmienok v piatich fermentačných pokusoch, robných v priebehu 3 mesiacov (priemer z piatich paralelných trepačkových baniek), sú uvedené v tab. 1.

Tabuľka 1

Dátum pokusu	Celková proteolytická aktivita (PU/1 ml)	Aktivita AP (PU/1 ml)	Aktivita NP (PU/1 ml)	Podiel AP (%)
30. 10. 86	18 123	417	17 706	2,3
22. 11. 86	17 830	370	17 460	2,1
26. 11. 86	17 024	355	16 668	2,1
17. 12. 86	17 680	358	17 322	2,0
21. 1. 87	18 262	402	17 860	2,2

Poznámka:

AP — alkalická proteínáza

NP — neutrálna proteínáza

Proteolytická aktivita bola stanovovaná modifikovanou Ansonovou metódou (substrát kazeín, 37 °C, pH 7,5) reakčná doba 10 min.), aktivita alkalického proteínázy bola stanovovaná s použitím selektívneho inhibítora dihydrátu dvojsodnej soli kyseliny etyléndiamintetraoctovej.

Kmeň bol pripravený z pôvodného kmeňa *Bacillus cereus*, ktorý produkoval proteolytické enzýmy s celkovou proteolytickou aktivitou 2 660 PU/1 ml a s aktivitou alkalického proteínázy 540 PU/1 ml, čo predstavuje 20,3 % z celkovej proteolytickej aktivity, osemnásobným pasážovaním cez kulti-

vačné médium so zložením (g . l⁻¹): síran meďnatý pentahydrát 5 . 10⁻³, síran železnatý heptahydrát 5 . 10⁻⁴, síran zinočnatý heptahydrát 5 . 10⁻³, síran manganatý monohydrát 5 . 10⁻², síran horečnatý heptahydrát 2 . 10⁻¹, chlorid vápenatý dihydrát 8 . 10⁻², hydrogénfosforečnan dvojamonný 2,0, chlorid draselný 0,5, kvasničný extrakt 4,0, glukóza 50,0, pH 7,0, s následným tridsaťminútovým tepelným opracovaním pri 80 °C, izoláciou spór, ktoré prežili, vo forme monokolónií na mäsopeptónovom agare (MPA), ich pomnožením na šikmých MPA a výberom najúspešnejšieho variantu.

PREDMET VYNÁLEZU

Kmeň *Bacillus cereus* CCM 3993, producent neutrálneho proteínázy.