



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

252600

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 1/20

(22) Přihlášeno 12 03 86

(21) PV 1706-86

(40) Zveřejněno 12 02 87

(45) Vydáno 15 03 88

(75)

Autor vynálezu

KUČEROVÁ HELENA RNDr., CHALOUPKA JIŘÍ RNDr. DrSc.,
VÁCHOVÁ LIBUŠE RNDr., PRAHA, PALEČKOVÁ FRANTIŠKA RNDr., SLUŠOVICE

(54) Bakteriální kmen *Bacillus subtilis* CCM 3853

Řešení se týká bakteriálního kmene *Bacillus subtilis* bez termorezistentních spór syntetizujícího exocelulární proteázy, uloženého v Československé sbírce mikroorganismů v Brně pod číslem CCM 3853. Výhodou mutantního kmene je to, že při kultivaci v tekutých nebo pevných médiích nevytvoří v průběhu 48 hodin při 28 °C termorezistentní spóry. Bakteriální kmen *Bacillus subtilis* lze využít k průmyslové produkci exocelulárních proteáz, použitelných například k přípravě pracích prášků i k hydrolýze a odstraňování různých bílkovinných materiálů.

Vynález se týká nového bakteriálního kmene *Bacillus subtilis* CCM 3 853 bez termorezistentních spór a syntetizujícího exocelulární proteázy. Charakteristickými znaky nového kmene je schopnost růstu a tvorby proteáz ve stejných tekutých živných médiích jako výchozí kmen, v nichž však nevytvoří během 48 hodin při 28 °C termorezistentní spóry. Spóry nevytvoří během 48 hodin ani ve zvláštním sporulačním médiu.

Je známo, že při výrobě exocelulárních enzymů, včetně proteáz, pomocí bacilů, je produkt kontaminován termorezistentními spórami produkčního kmene. To představuje určitou nevýhodu jak z hygienického hlediska, tak i z technologického hlediska, protože se zvyšují nároky na následnou sterilizaci fermentačního zařízení. Současně se zvyšuje nebezpečí kontaminace jiných fermentací a výrobků termorezistentními spórami *Bacillus subtilis*.

Naproti tomu je většina asporogenních mutant bacilů neschopná tvořit exocelulární proteázy.

Tyto nevýhody odstraňuje bakteriální kmen *Bacillus subtilis* bez termorezistentních spór a syntetizujícího exocelulární proteázy. Po mutagenním působení a výsevu mutant na pevné agarové živné médium obsahující kasein byla sledována současně u jednotlivých kolonií jak schopnost tvořit proteázu, tak i změněný tvar kolonie, který obvykle indikuje ztrátu schopnosti sporulovat. Tento postup vedl k získání mutanty syntetizujícího exocelulární proteázy bez termorezistentních spór.

Kmen byl získán po působení mutagenu ethylmetansulfonátu na vyklíčené spóry následujícím způsobem: spóry výchozího kmene 115 (AO 201 638, uloženého v čs. sbírce mikroorganismů pod číslem CCM 3 622) byly aktivovány v 0,1 M fosfátovém pufru o pH 7,2 zahřátím na 70 °C po dobu 15 minut a vyklíčeny v roztoku minerálních solí o pH 7,2 doplněných glukózou (5 mg/ml) a kvasničným extraktem (0,2 mg/ml) během 1 hodiny při 35 °C. Vyklíčená kultura byla přenesena do fosfátového pufru a mutagenizována působením 0,1 M ethylmetansulfonátu za třepání po dobu 17 hodin při 30 °C. Stupeň přežití vyklíčených spór byl 1%.

Mutagenizovaná kultura byla odstředěna, promyta fosfátovým pufrem a po resuspendování ve fosfátovém pufru vyseta na kaseinový agar. Kolonie lišící se od výchozího kmene buď morfologicky, nebo velikostí zóny natráveného kaseinu byly podrobeny podrobnějšímu zkoumání. Získané kmene byly lyofilizovány v 10% laktinu.

Dále jsou uvedeny charakteristiky vlastností nového bakteriálního kmene 115/6. Vzorek této mutanty je uložen v československé sbírce mikroorganismů v Brně pod číslem CCM/3 853.

a) Morfologická a růstová charakteristika

Výchozí kmen 115 i mutant 115/6 jsou tenké grampozitivní tyčinky, rostoucí v médiu s minerálními solemi a glukózou 5 mg/ml většinou jednotlivě nebo ve dvojicích. Specifická růstová rychlost obou se v tomto médiu při 30 °C pohybuje v rozmezí 0,43–0,55 h⁻¹ (generační doba 1,3–1,6 h). Při výsevu na živnou půdu (Nutrient agar Difco) roste kmen 115 ve formě hladkých kolonií s mírně nepravidelnými okraji a mutant 115/6 ve formě velkých nízkých kolonií, uprostřed lesklých, s rýhami paprskovitě se rozbíhajícími od středu.

b) Schopnost tvořit proteázy

Výchozí sporulující kmen 115 i od něho odvozená mutanta byla kultivována za třepání 48 hodin při 28 °C v médiu obsahujícím 5% sladinku, 1% sušených kvasnic, 2% sušeného mléka Laktino a 5% uhličitanu vápenatého (výchozí pH 7,5). Po 48 hodinách byly kultury odstředěny a v supernatantech stanovena proteolytická aktivita při pH 7,2 a 1% kaseinovým substrátem. Proteolytická aktivita je vyjádřena v tyrosinových jednotkách (TU/ml).

kmen	1. pokus	2. pokus	3. pokus
115	59,5	33,7	26,7
115/6	51,0	39,0	28,2

c) Schopnost tvořit termorezistentní spóry

Kultury vyrostlé za 8 hodin při 30 °C v minerálním médiu s 1 % glukózy a 0,2 mg/ml kvasničného extraktu byly odstředěny a resuspendovány na optickou hustotu odpovídající 1 mg/ml sušiny ve sporulačním médiu následujícího složení $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - 0,5 mM; K_2HPO_4 10 mM; CaCl_2 0,3 mM; octan sodný 5 mM; jantaran sodný 2 mM; pH 7,2.

Kultury byly potom za třepání inkubovány 48 hodin při 28 °C. Obsah termorezistentních spór byl zjišťován vyočkováním vzorků inaktivovaných 15 minut při 75 °C na Nutrient agar Difco. Počet kolonií vyrostlých po zředění $0-10^{-7}$ byl zjišťován po 24 hodinách. V rodičovské kultuře (115) byla zjištěna přítomnost $2,3 \times 10^{10}$ termorezistentních spór v 1 ml.

V kultuře mutanty nebyla zjištěna přítomnost žádných termorezistentních spór. Ani mikroskopickou kontrolou nebyly u mutanty v buňkách spóry zjištěny. V pokuse v produkčním sladidlovém médiu (viz b) vytvořil rodičovský kmen po 48 hodinách $2,9 \times 10^8$ termorezistentních spór v 1 ml (z $1,7 \times 10^9$ buněk/ml). Mutanta termorezistentní spóry nevytvořila.

Mutantu podle vynálezu lze využít k průmyslové produkci exocelulárních proteáz, použitelných například k přípravě pracích prášků i k hydrolýze a odstraňování různých bílkovinných materiálů.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Bakteriální kmen *Bacillus subtilis* CCM 3 853 bez termorezistentních spór syntetizující exocelulární proteázy.