



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

217 313

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 20 05 80
(21) PV 3508-80

(51) Int. Cl.³ C 12 N 1/20

(40) Zveřejněno 26 03 82

(45) Vydáno 01 08 85

(75)
Autor vynálezu

PAZLAROVÁ JARMILA RNDr. CSc.,

FENCL ZDENĚK RNDr. DrSc.,

TICHÝ PAVEL RNDr. CSc.,

PRAHA

(54)

Nový bakteriální kmen *Bacillus amyloliquefaciens* CCM 3502

Nový bakteriální kmen *Bacillus amyloliquefaciens* CCM 3502 vyznačující se vysokou produkcí alfa-amylázy.

Pracuje se buď vsádkovým či kontinuálním způsobem při pH 5,5 a teplotě 25 - 35 °C.

Tvorba uvedeného enzymu bývá doprovázena tvorbou proteazy.

Vynález se týká nového produkčního průmyslového bakteriálního kmene *Bacillus amylo-liquefaciens*, který je význačný vysokou produkcí exocelulárního enzymu α -amylázy.

Charakteristickým znakem tohoto nového kmene je schopnost růstu na škrobnatých substrátech doplněných organickým a anorganickým dusíkem za současné produkce enzymu α -amylázy. Produkční vlastnosti (schopnosti) kmene zůstávají plně zachovány jak při submersní vsádkové, tak kontinuální kultivaci, kde dochází k maximální expresi jeho genotypu.

Kmen *Bacillus amyloliquefaciens* byl získán řízenou selekcí výchozího kmene *Bacillus amyloliquefaciens* (který byl vyizolován z půdy) v podmínkách kontinuální kultivace. Možnost genetické nestabilnosti kultury za podmínek kontinuální kultivace je známa. Teorie přerůstání mutant je rozvíjena prakticky souběžně s rozvíjením teorie kontinuálních kultivací. Kultura výchozího kmene, z kterého byl získán nový kmen dle vynálezu, se v chemostatu rozpadala na nízko a vysokoprodukční motanty.

Kmen podle vynálezu byl získán v podmínkách kontinuální kultivace na mediích, jejich složení umožnilo potlačení neprodukční mutanty z výchozí populace. Syntetická půda (zdroj uhlíku glukóza, zdroj dusíku NH_4^+ nebo NO_3^-) stimulovala vznik nízkoprodukčních mutant, a naopak selkční tlak přirozeného media (zdroj uhlíku škrob, zdroj dusíku "corn - steep liquor") působil na pomnožení vysokoprodukční mutanty. Kromě složení media byla důležitým faktorem řízené selekce zředovací rychlost D (h^{-1}) užitá při kultivaci v chemostatu. Při nízkých zředovacích rychlostech (do $D = 0,15 \text{ h}^{-1}$) docházelo k limitaci živin i v přirozeném mediu, a složení populace se nezlepšovalo ve prospěch vysokoprodukčních mutant.

K získání vysokoprodukčních mutant byly nutné tyto podmínky : přirozená půda a zředovací rychlost v rozmezí od 0,18 do 0,30 h^{-1} . Analýza vysokoprodukčních mutant i buněk výchozího kmene ukázala, že během selekce v chemostatu došlo k získání dodatečné genetické informace, uložené mimo bakteriální chromozom na speciálním plasmidu. Tato plasmidová DNA nebyla u buněk výchozího kontrolního kmene nikdy zjištěna. Zvýšení produkce α -amylázy je současně řízeno jak chromosomální, tak nově získanou plasmidovou DNA. Závislost selekce na růstové rychlosti (v podmínkách chemostatu růstová rychlost = zředovací rychlost) byla potvrzena studiem růstových rychlostí vysokoprodukčních a neprodukčních mutant za definovaných podmínek. Bylo zjištěno, že mají různé maximální růstové rychlosti (μ_{max}), což je zřejmě výsledkem různých nároků těchto dvou mutant na aminokyseliny. Nižší růstová rychlost z produkční mutanty je způsobena tím, že vedle vlastní reprodukce ještě navíc syntetizuje exocelulární protein, a proto má vyšší potřebu substrátu. Z uvedeného vyplývá, že bez použití přesně definovaných zředovacích rychlostí určitého složení media a současné genetické analýzy, by nebylo možné získat vysokoprodukční mutantu a charakterizovat její fyziologické a genetické odlišnosti.

Dále je uvedena charakteristika vlastností nového bakteriálního kmene *Bacillus amyloliquefaciens*, jehož vzorec kultury je zařazen v československé sbírce mikroorganismů na Přírodovědecké fakultě J. E. Purkyně, Brno pod číslem CCM 3502.

a) Morfologická pozorování

1. Vegetativní buňky kmene *Bacillus amyloliquefaciens* jsou Gram- pozitivní pohyblivé tyčinky, elektrického až cylindrického tvaru.
2. Na tekutých půdách roste převážně jako jednotlivé tyčinky a jejich dvojice, zřídka v řetězcích.
3. Tvorba spor : jedna buňka netvoří více než jednu centrálně umístěnou endosporu. Spory jsou termoresistentní.
4. Růst na pevných půdách : kolonie na agaru jsou okrouhlé až nepravidelné, většinou průsvitné až bělavé. Profil kolonií je pravidelný a plochý. Povrch je většinou hladký, ale může být na sušších agarech až drsný. U starších kolonií jsou pozorovány náznaky pigmentace, která zbarvuje kolonie slabě do zelena.

b) Fysiologické charakteristiky

1. Kmen kultivovaný aerobně na glukóze tvoří kyselinu a katalázu.
2. Teplotní optimum kmene je mezi 25 - 35 °C. Teplotní maximum je mezi 45 - 55 °C.
3. Aktivní růst probíhá při pH 5,5 - 8,5.
4. Kmen redukuje NO_3^- na NO_2^- .
5. Na škrobnatých substrátech tvoří kmen značné množství extracelulárního enzymu α -amylázy. Tvorba tohoto enzymu bývá doprovázena tvorbou dalšího extracelulárního enzymu a to proteázy.
6. Kmen produkuje bakteriocin inhibující růst kmenů *Bacillus subtilis* 168 a z něj odvozených derivátů.

c) Genetická charakteristika

1. Kmen produkuje restriční endonukleázu, která byla identifikována jako restriční endonukleáza shodná co do velikosti a množství restričních fragmentů DNA s restriční endonukleázou BamHI, která byla nalezena pouze u kmenů *Bacillus amyloliquefaciens*.
2. Bakteriální kmen *Bacillus amyloliquefaciens* CCM 3502 se odlišuje od druhu *Bacillus amyloliquefaciens* (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Eight Edition, R.E. Buchanan and Wilkins Company, Baltimore 1974) tím, že nese plazmidovou DNA o molekulové hmotnosti 3,4 Mdal., která se charakteristickým způsobem štěpí.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Bakteriální kmen *Bacillus amyloliquefaciens* CCM 3502 pro výrobu enzymu α -amylázy vsádkovým i kontinuálním způsobem.