



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

233533

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 15 03 83
(21) (PV 1761-83)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 15/00

(40) Zveřejněno 13 08 84

(45) Vydáno 15 08 86

(75)

Autor vynálezu

PAVLASOVÁ EMILIE RNDr. CSc., STEJSKALOVÁ EVA RNDr.,
SIKYTA BOHUMIL RNDr. DrSc., PRAHA

(54) Kmen bakterie *Escherichia coli* CCM 3624

Předmětem vynálezu je kmen bakterie
Escherichia coli, vysokoproduční pro enzym
beta-galaktosidázu, označený jako K 12
(MU-10), uložený v Československé sbírce
mikroorganismů Univerzity J. E. Purkyně
v Brně pod číslem CCM 3624.

Vynález se týká kmeny bakterie *Escherichia coli* vysokoproduktivního pro enzym beta-galaktosidázu.

Enzym beta-galaktosidáza je použitelný v potravinářském průmyslu, neboť štěpí disacharid laktózu, obsaženou v mléce, na dva monosacharidy, glukózu a galaktózu. Tento enzym je možno použít pro přípravu tzv. bezlaktóзовého mléka, vhodného pro jedince lidské populace, kteří jsou intolerantní k tomuto cukru, a to zejména kojence, pro kterého je mléko základní potravinou. Intolerance k laktóze se vyskytuje též u některých zvířat, např. u selat. Tento defekt je u lidí, tak u zvířat má v populaci stoupající tendenci. Dalším přínosem hydrolýzy laktózy v mléce je získání glukózy a galaktózy s vyšší sledivostí, což má význam pro úsporu sacharózy k přípravě některých mléčných výrobků.

Získání výchozího stabilního kmeny *Escherichia coli* vysokoproduktivního pro beta-galaktosidázu je předpokladem pro přípravu enzymového preparátu imobilizovaných buněk *Escherichia coli* k přípravě bezlaktóзовého mléka v mlékařském průmyslu.

Předmětem vynálezu je nový kmen bakterie *Escherichia coli* vysokoproduktivní pro enzym beta-galaktosidázu, označený jako K 12 (MU-10), uložený v Československé sbírce mikroorganismů Univerzity J. E. Purkyně v Brně pod číslem CCM 3624.

Nový bakteriální kmen je charakterizován následujícími morfologickými a fyziologickými vlastnostmi:

mikroskopický vzhled: gram negativní opuzdřené pohyblivé tyčinky;
makroskopický vzhled: na minerálním médiu s glukózou nebo jiným cukrem tvoří hladké, lesklé, bělavé kolonie asi 3 mm v průměru.

V tekutém bohatém médiu roste ve formě zákalu a sedimentu, dobře roztřepatelného.

Fyziologické vlastnosti: optimální teplota pro růst 37 °C, optimální pH 7. Zvažuje laktózu, dextrózu, manitol, arabinózu, glyderol, dulcitol, menózu, melibiózu, rhamnózu, salicin, sorbit, trehalózu a xylózu. Nezvažuje sacharózu, adonit, celobiózu, manit, melezitózu a rafinózu. Indol tvoří, H₂S netvoří, lysin, ornitin ani arginin neštěpí. Voges-Proskauerova reakce na acetylmethyl verbinol je negativní, methylčervenový test je +, muvát je negativní, esculin nehydrolyzuje. Hemolýza je negativní; aglutinace *E. coli* 0,16 je slabší a opožděná.

Při přípravě této vysokoproduktivní mutanty *E. coli* K 12 (MU-10) bylo použito modifikované seleční metody T. Horiuchiho, J. Tomizawy a A. Novicova (Biochim. Biophys. Acta 55; 152 až 163 /1962/). Princip této metody spočívá v selekci mutant se zvýšenou produkcí beta-galaktosidázy v chemostatu na minerálním médiu za limityce růstu kultury laktózou. Touto metodou jsou nejprve selektovány z původního divokého kmeny induktivního pro beta-galaktosidázu konstitutivní mutanty pro tento enzym a v průběhu další kultivace za stejného selečního tlaku jsou selektovány mutanty s asi 4násobnou produkcí beta-galaktosidázy. Získané mutanty jsou však nestabilní a v průběhu několika generací v neselečních podmínkách ztrácejí zvýšenou produkční schopnost. Nestabilitu těchto hyperproduktivních mutant potvrzují též J. Claire, J. MacLeod, P. Dunill a M. D. Lilly (J. Gen. Microb. 89; 221 až 228 /1975/).

Modifikace seleční metody, kterou byla získána nová mutanta, vychází z pozorování V. Vojtíška, B. Střety a J. Slezáka ("Continuous Cultivation of Microorganism" Proc. of the 4th Symposium, Prague, Academia 1969; p. 215 až 223), že u hyperproduktivních kmenů za podmínek limityce růstu kultury glukózou jako jediným zdrojem uhlíku v chemostatu nedochází k poloze syntézy beta-galaktosidázy.

Pro získání stabilních hyperproduktivních mutant bylo použito selekce v chemostatu na minerálním médiu (M 56) o složení

KH_2PO_4	13,6 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
CaCl_2	0,01 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0005 g na 1 000 ml vody

s laktózou o koncentraci $1,5 \times 10^{-3}$ M jako limitním faktorem růstu kultury při nízké konstantní zředovací rychlosti $D = 0,1 \cdot \text{h}^{-1}$ (J. Monod, O. Cohen-Beziere, M. Cohn, Biochim. Biophys. Acta 7; 585 a dále /1951/). Tímto postupem byl v chemostatu získán vysokoproduční konstitutivní kmen, jehož produkční schopnost není stabilní po přenesení kultury z chemostatu. Proto byly z chemostatové kultury připraveny jednobloniové izoláty na minerálním médiu stejného složení (viz výše), ale namísto laktózy byla použita glukóza jako jediný uhlíkatý zdroj. Tyto jednobloniové izoláty byly otestovány na beta-galaktosidázovou aktivitu. Získané mutanty mají 8 až 10násobnou produkci beta-galaktosidázy. Nejlepší z nich po nárůstu na médiu s glukózou byly uchovávány ve formě vpichu do téhož pevného minerálního média, ale bez zdroje uhlíku. V této formě si kmeny zachovávají vysokou produkční schopnost 2 až 3 roky.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Kmen bakterie *Escherichia coli* CCM 3624, vysokoproduční pro enzym beta-galaktosidázu.