



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

232904

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 05 04 83
(21) (PV 7527-82)

(51) Int. Cl.³

C 12 R 1/125

(40) Zveřejněno 17 07 84

(45) Vydáno 15 08 86

(75)
Autor vynálezu

LAKOTA VLADIMÍR ing. CSc., BASTL VLADIMÍR ing., SLUŠOVICE,
ČERNÝ MIROSLAV RNDr. ing., PRAHA, PALEČKOVÁ FRANTIŠKA RNDr.,
SLUŠOVICE, ČULÍK KAREL RNDr., PRAHA

(54) Způsob šlechtění mikroorganismu *Bacillus subtilis* a vyšlechtěný kmen

Vynález se týká způsobu šlechtění mikroorganismu *Bacillus subtilis* pomocí mutagenních zásahů N-nitro-N-nitroso-metylguanidinem, N-nitroso-metylmocovinu a selekce mezi mutagenními pokusy, která sleduje produkci exoproteaz a vede k izolaci kmene se stabilní produkcí exoproteaz o aktivitě 8 000 až 10 000 SRN.

Vynález se týká šlechtění mikroorganismu *Bacillus subtilis*, zejména jeho kmene UV 120, za účelem získání jeho nového kmene se zvýšenou produktivitou exoproteáz i jeho sporulace, dávající záruky a předpoklady pro jeho využitelnost pro přípravu krmného biopreparátu použitelného jako přípravek do krmiva hospodářských zvířat.

Se sporulační fází je u bakteriálních mikroorganismů spojena řada biosyntetických aktivit, které těsněji nebo volněji souvisejí geneticky a fyziologicky s tvorbou spor. Např. maximální syntéza mimobuněčných proteolytických enzymů nastává před sporulací v pozdní exponenciální nebo v časně stacionární fázi růstu, polypeptidová antibiotika jsou produkována na začátku sporulace, amyláza v pozdějších stadiích sporulace apod.

Genetická analýza mutantů nesporulujících (Sp^-) nebo málo sporulujících (Sp^+) s ohledem na sporulaci a tvorbu exoproteáz ukázala, že vztahy mezi těmito a dalšími znaky, které souvisejí se sporulací, jsou vztahem pleiotropie. Tak např. pokusy s mutanti mikroorganismu *Bacillus subtilis* vyznačující se sníženou produkcí exoproteázy a fenotypem Sp^- a jejich reverzemi fenotypu Pr^+Sp^+ bylo dokázáno, že uvedený genetický vztah existuje.

Účelem vynálezu je vypracovat na základě uvedených genetických vztahů způsob šlechtění tohoto mikroorganismu, zejména pak jeho kmene UV 120, jehož charakterem je špatná sporulace a nízká produkce exoproteáz o syřivé aktivitě pouze kolem 3 500 j. a připravit nový kmen se zvýšenou schopností produkce exoproteáz a dobrou sporulací.

Šlechtění a selekce mikroorganismu *Bacillus subtilis* způsobem podle vynálezu spočívá v tom, že se na kulturách jeho vegetativních buněk působí N-nitro-N-nitroso-metylguanidinem v koncentraci $2 \cdot 10^{-1}$ mM ve vodném roztoku s hodnotou pH 8,0 po dobu 10 až 60 min. nečež se odizolují mutanty, které se dále podrobí mutagennímu působení N-nitroso-metylmočoviny ve vodném roztoku o hodnotě pH 6,0 v koncentraci $2 \cdot 10^0$ mM po dobu 20 min., případně se podrobí ozáření germicidní lampou o výkonu $10,7 \text{ J/m}^2/\text{s}$, jejíž UV světlo má maximum záření v oblasti vlnové délky 253,7 nm ze vzdálenosti 17 až 25 cm a mezi mutagenními pokusy se provede selekce podle produkce exoproteáz. Po dvou vložených pokusech selekce se získá stabilní kmen s vysokou produkcí exoproteáz.

Získaný materiál se testuje podle schopnosti produkce exoproteáz, výsledné izoláty jsou dále podrobeny mutagenním zásahům při střídání mutagenů a selekce s ohledem na produkci. Po čtyřnásobném opakování pokusu s N-nitro-N-nitroso-metylguanidinem a s N-nitroso-metylmočovinou a vložené selekci se izoluje stabilní kmen *Bacillus subtilis* CCM 3622, vyznačující se zvýšenou produkcí exoproteáz a dobrou sporulací.

Principem je aplikace mutagenu na suspenzi vegetativních buněk připravených 18hodinovou kultivací *Bacillus subtilis* UV 120 na jednoduché rozpustné půdě obsahující sacharidy jako zdroj uhlíku, dusíkaté sloučeniny jako zdroj dusíku a stopové prvky. Jako mutagenů je možno použít nitroso- a thio- sloučeniny charakterizované metyl- a alkyl- aktivitou s výhodou střídání dvou mutagenů a následné selekce. Rostoky mutagenů se připravují v pufru o pH 6,0 až 9,0 podle povahy mutagenu v koncentraci řádově $1 \cdot 10^0$ mM nebo $1 \cdot 10^{-1}$ mM v délce působení 10 až 60 minut.

Výchozí kmen UV 120 mikroorganismu *Bacillus subtilis*, který se vyznačuje produkcí exoproteáz o aktivitě cca 3 500 SRN, tvoří kolonie hladkého povrchu produkující hnědý pigment difundující do půdy. Uvedenými mutagenními zásahy a následnými selekcemi se získá kmen *Bacillus subtilis* CCM 3622, který má zvýšenou produkci exoproteáz o aktivitě 8 000 až 10 000 SRN a dobrou sporulaci. Na mesozeptomovém agarů tvoří drsné, menší kolonie a rovněž produkuje hnědý pigment difundující do živné půdy.

Po kultivaci kmene CCM 3622 obsahuje médium směs exoproteáz a dalších průvodních exometabolitů, čímž vzniká balancovaný preparát uplatňující se při výkrmu zvířat, neboť působením proteolytických enzymů se zvýší využití krmiva a to hlavně u zvířat s vlastní nedostatečnou účinností proteáz.

Příklad jeho kultivace:

Kulturou kmene *Bacillus subtilis* CCM 3622 vyrostlou na šikmém maso-peptovém agaru při 37 °C za dobu 3 až 4 dny a pak uloženou v chladničce při teplotě +5 °C se pomocí kličky očkuje 40 ml půdy v Erlenmayerových baňkách o obsahu 750 ml. Živná půda má toto složení (v % hmotnostních):

krmná žitná mouka	2,0 %
kukuřičná máčecí voda zahuštěná	3,0 %
sušené odtučněné mléko	1,5 %
sušené kvasnice	0,5 %

Hodnota pH této živné půdy se neupravuje - po sterilizaci má hodnotu kolem 6,0. Sterilizuje se při 120 °C po dobu 30 min. Sušené mléko jako 10% roztok se sterilizuje však zvlášť, rovněž při 120 °C, ale po dobu 20 min a teprve po sterilizaci se přidává do živné půdy už vysterilizované.

Živná půda se pak rozděluje do uvedených baňek po 40 ml a mikroorganismus se kultivuje na rotační třepačce s 240 ot/min a s výchytkou 25 mm. Vzorke ke stanovení proteáz se odebírají v 36., 48 a 72. hodině kultivace. Maximum produkce obvykle nastává ve 48. hodině a dále se už produkce nemění.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob šlechtění mikroorganismu *Bacillus subtilis*, zejména jeho kmene UV 120, vyznačující se tím, že na kulturu jeho vegetativních buněk se působí N-nitro-N-nitroso-metylguanidinem v koncentraci $2 \cdot 10^{-1}$ mM ve vodném roztoku s hodnotou pH 8,0 po dobu 10 až 60 min, načež se izolují mutanty, které se dále podrobí mutagennímu působení N-nitroso-metylmočoviny ve vodném roztoku o hodnotě pH 6,0 v koncentraci $2 \cdot 10^0$ mM po dobu 20 min, případně se podrobí ozáření germicidní lampou o výkonu $10,7 \text{ J/m}^2/\text{s}$, jejíž UV světlo má maximum záření v oblasti vlnové délky 253,7 nm ze vzdálenosti 17 až 25 cm a mezi mutagenními pokusy se provede selekce podle produkce exoproteáz a po dvou vložených pokusech selekce se získá stabilní kmen s vysokou produkcí exoproteáz.

2. Vyšlechtěný kmen mikroorganismu *Bacillus subtilis* sbírkového označení 3622 s vysokou produkcí exoproteáz o aktivitě 8 000 až 10 000 SRN.