



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

252604

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 1/20

(22) Přihlášeno 12 03 86

(21) PV 1708-86

(40) Zveřejněno 12 02 87

(45) Vydáno 16 05 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 3855

Řešení se týká bakteriálního kmene *Bacillus subtilis* CCM 3855, bez thermo-resistantních spor a syntetizující exocelulární proteázy. Výhodou mutantního kmene ve srovnání s dosud používaným kmenem a dalšími sporulujícími kmeny rodu *Bacillus* je to, že při kultivaci v tekutých nebo pevných médiích nevytvorí v průběhu 48 hodin při 28 °C thermo-resistantní spory. Produkce exocelulárních proteáz kmenem je stejná nebo poněkud vyšší než u původního produkčního kmene.

Vynález se týká nového bakteriálního kmene *Bacillus subtilis* CCM 3855 bez thermoresistentních spor a syntetizujících 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 thermoresistentní spóry. Spóry nevytvoří během 48 hodin ani ve zvláštním sporulačním mediu.

Je známo, že při výrobě exocelulárních enzymů, včetně proteáz, pomocí bacilů je produkt kontaminován thermoresistentními 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 thermoresistentními spórami *Bacillus subtilis*.

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

Tyto nevýhody odstraňuje bakteriální kmen *Bacillus subtilis* bez thermoresistentních spor a syntetizující exocelulární proteázy. Po mutagenním působení a výsevu na pevné agarové živné medium 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 mutantů syntetizující exocelulární proteázy bez thermoresistentních spor.

Kmen byl získán po působení mutagenu ethylmethansulfonátu na vyklíčené spóry následujícími způsoby: 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 ethylmethansulfonátu za třepání po dobu 17 hodin při 30 °C. Stupeň přežití vyklíčených spor byl 1 %.

Mutagenizovaná kultura byla odstředěna, promyta fosfátovým pufrům 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 kmeny byly lyofilizovány v 10% laktinu.

Dále jsou uvedeny charakteristiky vlastností nového bakteriálního kmene 115/13. Vzorek této mutanty je uložen v Československé sbírce mikroorganismů v Brně pod číslem CCM/3 855.

a) Morfologická a růstová charakteristika

Výchozí kmen 115 i mutanta 115/13 jsou tenké gram pozitivní tyčinky, rostoucí v mediu s minerálními solemi a glukózou 5 mg/mL většinou jednotlivě nebo ve dvojicích. Specifická růstová rychlost obou se v tomto mediu při 30 °C pohybuje v rozmezí 0,43 až 0,55 h⁻¹ (generační doba 1,3 až 1,6 h. Při výsevu na živnou pádu (Nutrient agar Difco) roste kmen 115 ve formě hladkých kolonií s mírně nepředvídatelnými okraji a mutanta 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 ze třepání 48 hodin při 28 °C v mediu obsahujícím 5 % sladinku, 1 % sušených kvasnic, 2 % sušeného mléka Laktinu a 5 % uhličitane vápenatého (výchozí pH 7,5). Po 48 hodinách byly kultury odstředěny a v supernatantech stanovena proteolytická aktivita při pH 7,2 s 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
115/13	45,5	51,8	33,4

c) Schopnost tvořit thermoresistentní spóry

Kultury vyrostlé ze 8 hodin při 30 °C v minerálním mediu s 1 % glukózy s 0,2 mg/ml kvasničného extraktu byly odstředěny a resuspendovány na optickou hustotu odpovídající 1 mg/mL sušiny ve sporulačním mediu 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; jantaren sodný 2 mM; pH 7,2).

Kultury byly potom za třepání inkubovány 48 hodin při 28 °C. Obsah thermoresistentních spór byl zjišťován vyočkováním vzorků inaktivovaných 15 minut při 75 °C na Nutrient agar Difco. Počet kolonií vyrostlých po zředění 0 až 10^{-7} byl zjišťován po 24 hodinách. V rodičovské kultuře (115) byla zjištěna přítomnost $2,3 \times 10^{10}$ thermoresistentních spór v 1 mL. V kultuře mutanty nebyla zjištěna přítomnost žádných thermoresistentních spór. Ani mikroskopickou kontrolou nebyly u mutanty v buňkách spóry zjištěny. V pokuse v produkčním sledinkovém mediu (viz b) vytvořil rodičovský kmen po 48 hodinách $2,9 \times 10^8$ thermoresistentních spór v 1 ml (z $1,7 \times 10^9$ buněk/ml). Mutante thermoresistentní spóry nevytvořila. Mutantu dle vynálezu lze využít k průmyslové produkci exocelulárních proteáz, použitelných na příklad k přípravě precích prášků i k hydrolýze a odstraňování různých bílkovinných materiálů.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Bakteriální kmen *Bacillus subtilis* CCM 3 855 bez thermoresistentních spór syntetizující exocelulární proteázy.