



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY

A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

236 206

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 30 06 83
(21) PV 4880-83

(51) Int. Cl.³
C 12 N 1/20

(40) Zveřejněno 17 09 84
(45) Vydáno 01 02 88

(75)
Autor vynálezu

KONIČKOVÁ-RADOCHOVÁ MILUŠE RNDr.CSc.,
SMĚKAL FRANTIŠEK RNDr.CSc.,
KRUMPHANZL VLADIMÍR prof.ing.DrSc., PRAHA

(54)

Průmyslový bakteriální kmen Brevibacterium
sp. CCM 3632

Vynález se týká průmyslového bakteriálního kmene Brevibacterium sp. M27/P28 produkujícího L-Lysin, uloženého v Československé sbírce mikroorganismů University J.E. Purkyně tř. Obránců míru 10, Brno, pod označením CCM číslo 3632. Vyznačuje se zvýšenou produkcí esenciální aminokyseliny proti výchozímu rodičovskému kmeni Brevibacterium sp.

Vynález se týká nového průmyslového bakteriálního kmene *Brevibacterium* sp. ^{CCM 3632} produkujícího L-lysin ve zvýšeném výtěžku. Kultivace probíhá v tekutých fermentačních médiích, která obsahují jako hlavní zdroj uhlíku pro růst a produkci esenciální aminokyseliny, sacharidy /sacharosu nebo jiné cukry/ a jako zdroj dusíku kukuřičný extrakt, hydrolyzáta arašídové mouky a další růstové faktory včetně minerálních solí.

Podstatou vynálezu je nový průmyslový kmen *Brevibacterium* sp. M27/P 28 produkující L-lysin, uložený v Československé sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně, tř. Obránců míru 10, Brno, pod označením CCM číslo 3632.

Způsob přípravy nového produkčního kmene *Brevibacterium* sp. je založen na aplikaci mutagenního faktoru N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidinu, který indukuje nové mutantní kmeny charakterizované jiným typem pigmentace. Získaní chromogenní mutanti se dále vyznačují zvýšenou produkcí esenciální aminokyseliny proti výchozímu rodičovskému kmeni *Brevibacterium* sp.

Tímto způsobem byl připraven chromogenní mutant s okrovou pigmentací. Jako výchozí materiál pro mutagenesi byl použit kmen *Brevibacterium* sp. M27 hom⁻AEC^r světle žluté pigmentace, produkující v průměru 30,5 g/l L-lysinu po 96 hod. kultivaci.

Dále je uvedena morfologická a fyziologická charakteristika kmene podle vynálezu označeného jako *Brevibacterium* sp. M27/P28.

Morfologie kmene:

a/ kolonie na kompletní agarové půdě po 72 hod. kultivace při 29 °C:

tvár okrouhlý
okraje rovné
povrch lesklý
profil konvexní s mírně vyvýšeným středem
barva žlutookrová
velikost 2 až 3 mm

b/ mikroskopicky:

tyčinky krátké silné, ojediněle delší
velikost: šířka 1,0 až 1,2 ,u
délka 2,0 až 3,6 ,u
barvení podle Grama pozitivní

Genetická charakteristika: kmen je dependentní na homoserin a resistentní k AEC.

U rodičovského kmene *Brevibacterium* sp. M27 a u mutantního kmene se změněnou pigmentovou charakteristikou bylo provedeno testování utilisace některých zdrojů C a N a stanoveny další jejich biochemické vlastnosti.

Substrát	Kontrola	Testovaný produkční mutantní kmen
	M27	M27/P28 COM 3632
glukosa	+	+
laktosa	-	-
sacharosa	+	+
indol	-	-
sirovodík	-	-
močovina	+	+
red. NO ₃	+	+
citrát	+	+
manit	-	-
pohyblivost	-	-

Z tabulky vyplývá, že základní biochemická charakteristika mutantního kmene a rodičovského kmene *Brevibacterium* sp. M27 je totožná.

Postup získání mutantních kmenů

Za účelem získání mutantních kmenů *Brevibacterium* sp. M27 se změněnou pigmentací a zvýšenou produkcí esenciální aminokyseliny bylo pro šlechtění rodičovského kmene použito mutačního procesu. Jako mutagen byla zvolena účinná chemická látka N-methyl-N^o-nitroso-N-nitroguanidin /Koch-Light, England/.

Suspense bakterií z exponenciální fáze růstu byla připravena kultivací v tekuté kompletní půdě po dobu 24 hod. při 29 °C. Po promytí a resuspendování buněk v 0,2 M tris-maleinovém pufru o pH 6,0 byl stanoven výchozí počet buněk vyočkováním různých ředění kultury na sérii Petriho misek s kompletní agarovou půdou. K odměřené části suspense byl přidán mutagen rozpuštěný v pufru v takovém množství, aby konečná koncentrace byla 1 mg/ml. Reakční směs byla inkubována ve vodní lázni při 29 °C. Zastavení působení mutagenu bylo provedeno přidáním desetinasobného množství 4 °C chladného tris-maleinového pufru a zcentrifugováním. Bylo zvoleno několik dob působení mutagenu, aby přežití buněk bylo v rozmezí od 10 do 0,1 %. Po působení mutagenu byla suspense vyočkována na kompletní agarovou půdu a inkubována 72 hod. při 29 °C. Potom byly izolovány a dále hodnoceny kolonie se změněnou pigmentací.

Fermentační hodnocení chromogenního mutantu *Brevibacterium* sp. M27 bylo prováděno na tekutých živných půdách v baňkách v laboratorním měřítku na rotační třepačce při teplotě 29 °C po dobu 96 hod. kultivace.

Způsob fermentace a produkce lysinu mutantním kmenem uvádí následující příklad.

Příklad

Kulturovou produkčního mutantu *Brevibacterium* sp. M27/P28 se zaočkuje 50 ml inokulačního media ve varné baňce o obsahu 500 ml. Složení média: sacharosa tech. 20 g, octan sodný kryst. 40 g, kukuřičný extrakt /60 % hm. suš./ 30 g, voda dest. ad 1000 ml. Zaočkována kultura se kultivuje na rotační třepačce /240 ot.min⁻¹/ při 29 °C po dobu 18 až 24 hod. Vyrostlou kulturou v množství 10 % objemu je zaočkováno 20 ml fermentačního media /ve varné baňce o obsahu 500 ml/ následujícího složení:

sacharosa tech. 180 g, hydrolysát arašidové mouky 200 ml, corn-steep /60 % suš./ 10 g, hydrogenfosforečnan draselný 1 g, síran hořečnatý kryst. 0,1 g, uhličitan vápenatý mletý 30 g, voda dest. ad 1000 ml, pH fermentačního média po sterilizaci 6,8 až 7,0. Kultivace se provádí na rotační třepačce při 29 °C po dobu 96 hod. V průběhu fermentace se upravuje pH 10 % roztokem amoniaku na hodnotu 7,0. Produkce lysinu u chromogenního mutanta *Brevibacterium* sp. M27/P28 činí 50,1 g lysinu/l fermentačního média/96 hod. fermentace.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

263 206

Průmyslový bakteriální kmen *Brevibacterium* sp. CCM 3632,
produkující L-lysin.