



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

201638
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 9/56

(22) Přihlášeno 15 11 77
(21) (PV 7522-77)

(40) Zveřejněno 31 03 80

(45) Vydáno 15 07 82

(75)

Autor vynálezu

PALEČKOVÁ FRANTIŠKA RNDr., PRAHA

(54) Způsob šlechtění mikroorganismu *Bacillus subtilis* a kmeny *Bacillus subtilis* CCM 2792 a CCM 2793 získané tímto způsobem

Vynález se týká způsobu šlechtění mikroorganismu *Bacillus subtilis* a kmenů *Bacillus subtilis* CCM 2792 a CCM 2793 získaných tímto způsobem. Jak je známo, produkuje jmenovaný mikroorganismus směs exoproteáz a jiných látek, jejichž produkce je spojena s určitou etapou životního cyklu buňky. Způsob šlechtění a šlechtěním získané kmeny byly především orientovány na tvorbu směsi exoproteáz s vysokým obsahem neutrální proteázy, která by byla vhodná pro použití jako syřidlo při výrobě sýrů. Způsobem šlechtění podle vynálezu připravené kmeny produkují exoproteázy při kultivaci na půdách s krmnou pšeničnou moukou v kombinaci se sladinou, sušeným mlékem a kvasničným extraktem nebo sušenými kvasnicemi.

Během sporulace produkuje mikroorganismus *Bacillus subtilis* směs tří proteolytických enzymů, z nichž jeden patří do skupiny metaloenzymů a druhý do skupiny serinoenzymů, třetí je esteráza. Tyto enzymy jsou uvolňovány do média od konce růstové fáze až do doby vytvoření prespor. V této době je rozdělení jejich aktivity toto: metaloproteáza má 20 % celkové proteolytické aktivity, serinoproteáza 80 % proteolytické a 15 % esterolytické aktivity a esteráza 85 % esterolytické aktivity (J. Millet, J. Appl. Bact. 33, 207, 1970). U mutantů blokovaných v počátečních

stádiích sporulace je poměr jednotlivých enzymů různý. Tímto zjištěním a sledováním požadavku na složení mikrobiálního syřidla (ve kterém je žádoucí převaha enzymu aktivního v neutrálním prostředí) bylo vedeno šlechtění a selekce mikroorganismu *Bacillus subtilis* způsobem podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se na kulturu mikroorganismu působí N-methyl-N-nitro-N'-nitrosoguanidinem ve vodném roztoku s hodnotou pH 8,0, v koncentraci 7 mM, po dobu 30 minut, načež se vzniklé mutanty dále nejméně dvakrát selektují na masopeptonovém agaru a získaný stabilní kmen schopný sporulace, produkující směs exoproteáz s maximálním obsahem neutrální proteázy a s vysokou syřivou aktivitou produkovaných exoproteáz, vyjádřenou jednotkami SRN (Srinivasan), se izoluje.

Způsob podle vynálezu je charakterizován použitím vícenásobné selekce při sledování dvou a více znaků, přičemž v každém stupni je brán zřetel na dva z nich. Pro získání kmenů se specifickými vlastnostmi producentů exoproteáz se šlechtění řídí těmito kritérii:

- a) schopností produkovat směs exoproteáz s maximálním obsahem neutrální proteázy,
- b) schopností sporulace,

c) množstvím produkovaných exoproteáz, hodnocených podle sýřivé aktivity.

Principem způsobu šlechtění podle vynálezu je aplikace mutagenů a následující více-
stupňová selekce. Jako mutagenů je možno používat z chemických činidel zejména nitroso- a thiosloučeniny, charakterizované methylační nebo ethylační aktivitou, z fyzikálních činidel pak ultrafialové záření nebo gamma-paprsky. U kmene *Bacillus subtilis* se výhodně osvědčil N-methyl-N-nitro-N'-nitrosoguanidin, který se aplikuje na suspenzi spor, popřípadě buněk u nesporulujících kmenů. Roztok mutagenů se připravuje v tris-maleátovém pufru s hodnotou pH 8,0 o koncentraci 7 mM. Po 30 minutách působení mutagenů přežívá asi 60 % spor.

Z pokusu se vybírá nejvariabilnější izolát z hlediska variability výše uvedených znaků. Tento v podstatě „výchozí“ kmen se dále selektuje, přičemž nový izolát se vybírá podle dvou ze tří uvedených kritérií. Selekce se opakuje tak dlouho, až se získá stabilní kmen se žádanými znaky. Tím, že se v každém stupni selekce vybírá podle dvou znaků, a to nikoli vždy podle stejných, ale podle kombinace dvou ze tří, získá se po relativně kratší době stabilní kmen se všemi třemi žádanými znaky.

Mateřský kmen *Bacillus subtilis*, izolovaný z přírodních zdrojů (uložený ve sbírce LAKTOFLORA), představoval při růstu na masopeptonovém agaru populace různých morfologických typů: drsné kolonie s ostrým okrajem; hladké kolonie s laločnatým okrajem; hladké matné kolonie s rovným okrajem. Produkce na půdě s pšeničnou moukou je 1900 SRN (jednotky sýřivé aktivity podle Srinivasana), ve směsi je 30 % neutrální proteázy, kmen sporuluje.

Selekcí získané mutanty *Bacillus subtilis* byly uloženy v Čs. sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně v Brně, tř. Obránců míru 10, pod čísly CCM 2792 a CCM 2793. Mutanta označená CCM 2792 tvoří při růstu na masopeptonovém agaru hladké matné kolonie. Produkce exoproteáz na půdě s pšeničnou moukou je 3500 až 4000 SRN, ve směsi je 70 až 80 % neutrální proteázy, kmen sporuluje. Mutanta označená CCM 2793 se od předešlé mutanty morfologicky neliší, na půdě s pšeničnou moukou produkuje 3800 až 4300 SRN, ve směsi je 70 až 85 % neutrální proteázy. U kmene je snížena schopnost sporulace (oligosporogenní kmen).

Jak je na první pohled patrné při srovnání s výchozím kmenem bylo dosaženo způsobem šlechtění podle vynálezu u nových kmenů *Bacillus subtilis* CCM 2792 a CCM 2793 nejméně dvojnásobného zvýšení obsahu neutrální proteázy a sýřivé aktivity.

Schopnost získaných kmenů produkovat zvýšená množství exoproteáz se s výhodou uplatňuje na půdách s pšeničnou moukou jako zdrojem uhlíku, a to v koncentraci 8 až 3 % hmot. jak za laboratorních (reciproká třepačka, 96 kvů/min., výkyv 9 cm) tak i provozních podmínek na stejných půdách, při teplotě 37 °C, jak je blíže objasněno v následujících příkladech provedení.

Příklad 1

Kulturou kmene *Bacillus subtilis* CCM 2792 nebo 2793, která vyrostla na šikmém masopeptonovém agaru při 37 °C po čtyř- až pětidenní kultivaci a pak byla uložena v lednici při 5 °C, se kličkou očkuje 80 ml produkční půdy, umístěné v 750 ml Erlenmayerových baňkách, jež má toto složení (v % hmot.):

krmná pšeničná mouka	8,0
zahuštěná sladina	5,2
odtučněné sušené mléko	1,25
kvasničný extrakt nebo sušené kvasnice	0,6
voda	do 100,0

hodnota pH po sterilizaci (neupravuje se) je kolem 6,0. Sterilizace probíhá při 120 °C po dobu 30 minut. Sušené mléko se sterilizuje zvláště jako 10 % vodný roztok při 120 °C po dobu 20 minut a přidává se do sterilní půdy. Kultivuje se na reciproké třepačce (96 kvů/min.). Vzorky pro stanovení sýřivé aktivity se odebírají po 24 hodinách. Maximálních hodnot se obvykle dosáhne v 72. hodině, dále už se podstatně nemění. Uvedeným postupem se získá u kmene *B. subtilis* CCM 2793 produkce exoproteáz s průměrnou sýřivou aktivitou 4000 SRN a se 75 % neutrální proteázy, u kmene *B. subtilis* CCM 2792 pak aktivita 3800 SRN se 70 % neutrální proteázy.

Příklad 2

Udržování kultur těchto mikroorganismů jako v příkladu 1 a očkování produkční půdy je stejné jako ve zmíněném příkladu. Produkční půda má toto složení (v % hmot.):

krmná pšeničná mouka	3,0
zahuštěná sladina	5,2
odtučněné sušené mléko	2,0
kvasničný extrakt nebo sušené kvasnice	0,3
voda	do 100,0

pH se neupravuje, po sterilizaci má hodnotu kolem 6. Sterilizace a příprava půdy, očkování a kultivace jsou stejné jako v příkladu 1, rovněž tak stanovení sýřivé aktivity. Maximální produkce exoproteáz je u kmene *B. subtilis* CCM 2793 4200 SRN s 80 % neutrální proteázy, u kmene *B. subtilis* CCM 2792 4000 SRN se 75 % neutrální proteázy.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob šlechtění mikroorganismu *Bacillus subtilis*, vyznačující se tím, že se na kulturu mikroorganismu působí N-methyl-N-

nitro-N'-nitrosoguanidinem ve vodném roztoku s hodnotou pH 8,0, o koncentraci 7 mM, po dobu 30 minut, načež se vzniklé mutan-

ty dále nejméně dvakrát selektují na masopeptonovém agaru a získaný stabilní kmen schopný sporulace, produkující směs exoproteáz s maximálním obsahem neutrální proteázy a s vysokou sýřivou aktivitou produkovaných exoproteáz, vyjádřenou jednotkami SRN, se izoluje.

2. Kmen *Bacillus subtilis* CCM 2792 získaný způsobem podle bodu 1.

3. Kmen *Bacillus subtilis* CCM 2793 získaný způsobem podle bodu 1.