



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

234909

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 1/29

[22] Přihlášeno 11 07 83
[21] (PV 5214-83)

[40] Zveřejněno 31 08 84

[45] Vydáno 15 01 87

[75]
Autor vynálezu

KONÍČKOVÁ MILUŠE RNDr. CSc., SMĚKAL FRANTIŠEK RNDr. CSc.,
KRUMPHANZL VLADIMÍR prof. ing. DrSc., PRAHA

(54) Průmyslový bakteriální kmen *Brevibacterium* sp. CCM 3633

1

2

Vynález se týká průmyslového bakteriálního kmene *Brevibacterium* sp. CCM 3633, uložený v Československé sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně, tř. Obránců míru 10, Brno, pod označením CCM číslo 3633.

Vyznačuje se zvýšenou produkcí esenciální aminokyseliny proti výchozímu rodičovskému kmeni *Brevibacterium* sp.

Vynález se týká nového průmyslového bakteriálního kmene *Brevibacterium* sp. CCM 3633, 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 (sacharózu nebo jiné cukry) a jako zdroj dusíku kukuřičný extrakt, hydrolyzát arašídové mouky a další růstové faktory včetně minerálních solí.

Podstatou vynálezu je nový průmyslový kmen *Brevibacterium* sp. M27/P34 produkující L-lysin, uložený v Československé sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně, tř. Obránců míru 10, Brno, pod označením CCM číslo 3633.

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. Získání chromogenní mutanti se dále vyznačují zvýšenou produkcí esenciální aminokyseliny proti výchozímu rodičovskému kmeni *Brevibacterium* sp. Tímto způsobem byl připraven chromogenní mutant s růžovou 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 96hod. kultivaci.

Dále je uvedena morfologická a fyziologická charakteristika kmene podle vynálezu označeného jako *Brevibacterium* sp. M 27/P34.

Morfologie kmene:

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

tvár okrouhlý
okraje mírně vroubkované
povrch matný
profil konvexní s mírně výrazným středem
barva růžová
velikost 2 až 3 mm

b) mikroskopicky

tyčinky silné krátké i delší, časté uspořádání ve dvojicích

velikost:

šířka 1,0 až 1,2 μ
délka 2,0 až 3,6 μ

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 utilizace některých zdrojů C a N a stanoveny další jejich biochemické vlastnosti.

Substrát

	Kontrola M27	Testovaný produkční mu- tantní kmen M27/P34 CCM 3633
glukóza	+	+
laktóza	—	—
sacharóza	+	+
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'-nitroso-N-nitroguanidin (Kooh-Light, England).

Suspenze 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 suspenze 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 desetinásobného 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 suspenze vyočkována na kompletní agarovou půdu a inkubována 72 hodin při 29 °C. Potom byly izolovány a dále hodnoceny kolonie se změněnou pigmentací.

Fermentační hodnocení chromogenního mutanta *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 mutanta *Brevibac-*

terium sp. M27/P34 se zaočkuje 50 ml inokulačního média ve varné baňce o obsahu 500 ml. Složení média: sacharóza tech. 20 gramů, octan sodný kryst. 40 g, kukuřičný extrakt (60 % hmot. 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. Vyrůstlou kulturou v množství 10 % objemu je zaočkováno 20 ml fermentačního média (ve varné baňce o obsahu 500 ml) následujícího složení: sacharóza tech. 180 g, hydrolyzáta arašídové mouky 200 ml, cornsteep (60 % suš.) 10 g, hydrogenfosforečnan draselný 1 g, síran hořečnatý kryst. 0,1 g, uhličitán 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/P34 činí 52,3 g lysinu/l fermentačního média/96 hod. fermentace.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Průmyslový bakteriální kmen *Brevibacterium* sp. CCM 3633 produkující L-lysin.