



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

195478

(11)

(B1)

/22/ Prihlášené 20 05 77
/21/ /PV 3327-77/

(40) Zverejnené 31 05 79

(45) Vydané 15 05 82

(51) Int. Cl.³
C 12-K.1/02

(75)

Autor vynálezu

WELWARD LADISLAV ing. CSc., BANSKÁ BYSTRICA,
FRIMM RICHARD doc. ing. CSc., KOŠALKO RUDOLF ing. CSc., BRATISLAVA
a POTANČOKOVÁ MARTA, BANSKÁ BYSTRICA

(54) Kmeň mikroorganizmu *Acremonium chrysogenum* CCM F-644

1

2

Vynález sa týka kmeňa mikroorganizmu *Acremonium chrysogenum* CCM F-644 produkujúceho cefalosporín C.

Tento kmeň bol získaný z kmeňa *Cephalosporium acremonium* WIS OP-163 šľachtením zameraným na zvýšenie produkcie cefalosporínu C. Východzí kmeň pred šľachtením dosahoval produkčnú aktivitu na baničkách 800 až 1 000 µg/ml.

Cefalosporínové antibiotiká sú v súčasnosti vyrábané väčšinou za pomoci kmeňa *Cephalosporium acremonium*, ktorý bol novšie reklasifikovaný na *Acremonium chrysogenum* /Gams, W. 1971, *Cephalosporium* - *Schimmelpilze-Hyphomycetes*.

Tieto mikroorganizmy majú eukarotický organizmus s membránou ohraničujúcou jadro, s chromozómalnou organizáciou a s cytoplazmou s pomerne komplexnou štruktúrou - mitochondrie, endoplazmatické retikulum. Základnou bunečnou formou sú hýfy s prepážkami - septami. Kmeň sa reprodukuje nepohlavne mitózou a bunečnou alongáciou - predĺžením. Bunky *Acremonium chrysogenum* sú v submerznej kultúre heterogénne - zistili sa štyri typy buniek: hýfy, arteospóry, konídie a kľúčiacie konídie.

Maximálna rýchlosť syntézy antibiotika je spojená s morfológickou diferenciáciou hýfových vlákien do hrubých vysoko septovaných fragmentov - arteospór. Arteospóry majú cca o 40 % vyššiu produkciu antibiotika ako iné morfológické formy.

Popisovaný kmeň bol získaný nasledovne: V prvej fáze informatívneho šľachtenia sa vychádzalo z materského kmeňa *Cephalosporium acremonium* WIS OP-163. Kmeň bol vysta-

vený mutagénnemu pôsobeniu UV-svetla, pričom sa zistilo, že je veľmi sensiblný na tento mutagén, o čom svedčila aj získaná fluktučná závislosť. Po 1 min zásahu s UV-svetlom bola u získaných mutant produkčná aktivita od 57,1 % do 120,3 %. Z tohoto zásahu získaný najlepší izolát - pracovné označenie 6C₁₁ a podrobil pasívnej selekcii a získal izolát 6C_{1p}. Takto sa postupovalo až po konečný izolát pracovného označenia 7/a VÜPL, pre ktorý sa v ďalších fázach optimalizovali kultivačné podmienky.

Schematický postup šľachtenia je uvedený na priloženej schéme číslo 1.

Metodika pôsobenia fyzikálneho mutagénu

Príprava suspenzie spór: Vysporulovaná kultúra produkčného kmeňa na šikmom agare v Endovej skúmavke na sporulačnej pôde PU sa zmyla 10 ml sterilnej vody, prefiltrovala cez vatovú zátku na pipetu za účelom zbavenia hýf a arteospór. Z tejto suspenzie vhodne nariadenej sa očkovali Petriho misky s pôdou NB-II. Zloženie pôdy PU: kvasničný extrakt Difco 0,4 %, kazeínový enzymatický hydrolyzát 0,3 %, glukóza 1 %, FeSO₄·7H₂O 0,005 %, MgSO₄·7H₂O 0,005 %, D,L-metionín 0,005 %, L-cystein 0,005 % a agar Difco 2,5 %.

Pôda NB-II: Bacto BEEF extrakt 0,3 %, bacto peptone 0,5 %, glukóza 1 %, FeSO₄·7H₂O 0,005 %, MgSO₄·7H₂O 0,005 %, D,L-metionín 0,005 %, L-cystein 0,005 %, agar Difco 2,5 %.

Mutagénny zásah: Ako zdroj žiarenia sa použila germicídna UV-lampa Philips TUV 30 W

s rozdelením spektrálnej energie - vlnová dĺžka 253,7 nm až 93,5 % ostatné vlnové dĺžky 6,5 %. Vzdialenosť misky od zdroja žiarenia bola 30 cm. Po ožiarení sa misky okamžite preniesli do inkubátora na teplotu 28 °C, kde sporulovali 11 dní. Vysporulované kolónie boli za aseptických podmienok izolované kľučkou a prenesené na šikmý agar pôdy NB-II.

Vegetatívne inokulum sa pripravuje v 500 ml varných bankách plnených 60 ml pôdy IP-5 nasledujúceho zloženia: sacharóza 1,5 percent, kukuričný výluh 0,5 %, octan amónny 0,5 %, metyloleát 0,08 %, metionín 0,1 percent. Naočkovanie tejto pôdy sa robí kľučkou zo spórmi zo šikmého agaru. Kultivácia trvá 72 hodín na rotačnom trepacom stroji pri 220 obrátok za minútu a výstredníku 25 mm pri teplote 28 °C. Z narasteneho vegetatívneho inokula sa 4 ml očkujú produkčné 500 ml banky plnené 60 ml pôdy PP-XIII nasledujúceho zloženia: kukuričný škrob 4,5 %, arašidová múka 6 %, sacharóza 0,5 %, glukóza 0,7 %, CaCO₃ 1 %, D,L-metionín 1,7 % a borax 0,05 %, metyloleát 2,5 %. Kultivácia na rotačnom trepacom stroji o 250 obr./min pri t = 28 °C 168 hodín.

Produkčné porovnanie kmeňa Cephalosporium acremonium WIS OP-163 s izolátom 7/a VŮpL a izolátom 6/c VŮpL

Laboratórne baničkové pokusy - výsledky:

Pokus č.	kmeň	prod. aktivita μg/ml CFS-C	doba ná- rastu ino- kula hod.
1	OP-163 WIS	1 000	48
1	7/a VŮpL	2 770	48
2	OP-163 WIS	1 090	72
2	7/a VŮpL	2 840	72
konzervy lúpaný jačmeň			
3	OP-163 WIS	1 120	72
3	7/a VŮpL	3 280	72

4	6/c VŮpL	2 830	72
4	7/a VŮpL	3 020	72

Výraznejší efekt nového kmeňa 7/a VŮpL sa ukázal pri skúškach v laboratórnom fermentačnom tančíku Chemap 0030, ktorý bol plnený 18 l pôdy PP-XIII. Vzdušenie bolo 0,8 objemu vzduchu na objem pôdy, miešanie 600 obr./min, t = 28 °C do 24 hod kultivácie, potom do konca 23 °C. Dosiahnuté výsledky sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Prod. kmeň	Produkčná aktivita μg/ml CFS-C	Hod. kultivácie
OP-163 WIS	1 350	141
7/a VŮpL	5 100	164

Morfológia kmeňa: Kmeň *Acremonium chrysogenum* CCM pracovného označenia 7/a VŮpL tvorí pri monokolóniovom rozseve krémovobéžové kolónie o veľkosti 6 až 9 mm za 11 dní za použitia pôdy NB-II. Okraje kolónie sú radálne vráskované tak isto samotná kolónia, pričom v strede kolónii je kráter.

Konidie majú elipsoídný tvar dĺžky 1,5 až 2 μm. Kmeň je dobre stabilný aj po pasážovaní do 4. generácie, nestráca produkčnú schopnosť. Pre propagáciu používame striedavú pasáž vegetatívne inokulum - pevná pôda agarová - vegetatívne inokulum - sypký substrát jačmeň. Základné konzervy kmeňa sa uchovávajú na zmesi hlina-piesok a skladujú pri 5 °C, šikmé agary a jačmenné konzervy sa skladujú maximálne 3 mesiace pri -15 °C.

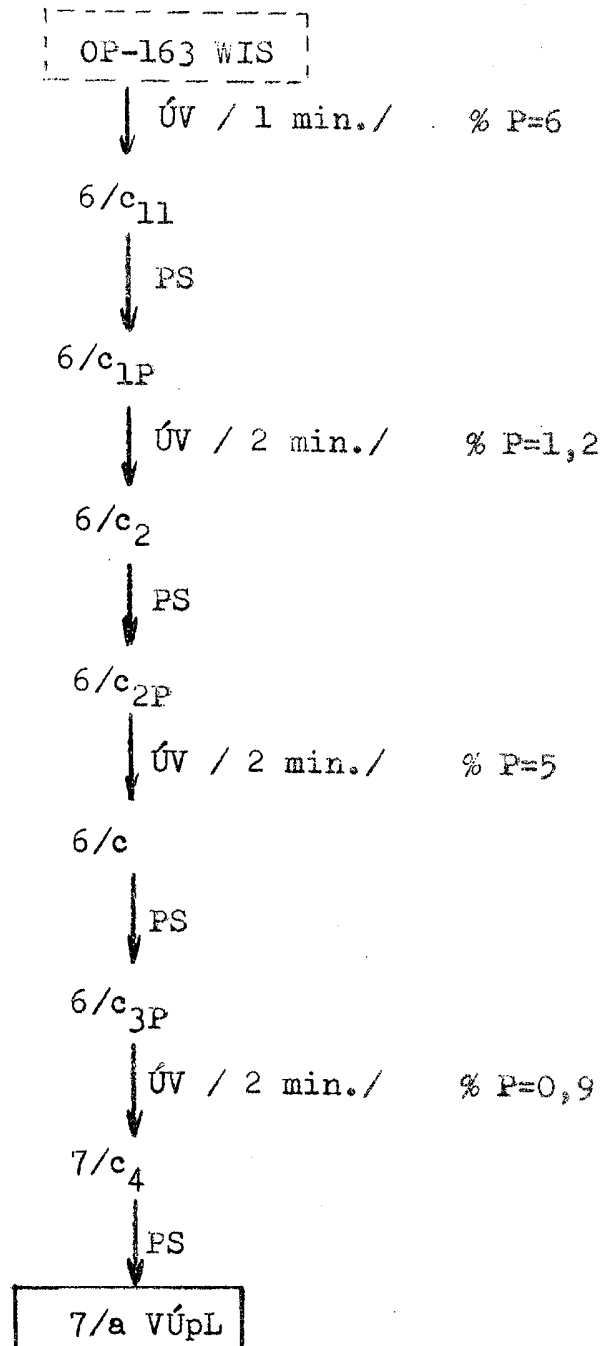
Kmeň *Acremonium chrysogenum* 7/a VŮpL bol uložený v Československej zbierke mikroorganizmov /Czechoslovak Collection of Microorganisms/ Univerzita J. E. Purkyne, Brno, Trieda Obrancov mieru 10 pod číslom CCM F-644.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Kmeň mikroorganizmu *Acremonium chrysogenum* CCM F-644 produkujúci cefalosporín C.

1 list výkresov

Schéma 1.



legenda:

ÚV -ultrafialové žiarenie

PS -pasívna selekcia

% P - percento prežívajúcich jedincov po ÚV svetle