



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

202900

(11)

(B1)

/22/ Přihlášeno 01 02 79
/21/ /PV 725-79/

(51) Int. Cl.³
C 12 P 15/00

(40) Zveřejněno 30 05 80

(45) Vydáno 15 09 82

(75)

Autor vynálezu

VOJTIŠKOVÁ LENKA dr., ZELENÝ KAREL dr., PRAHA, MATELOVÁ VLASTA dr.,
ROZTOKY u Prahy a ČULÍK KAREL dr., PRAHA

(54) Způsob získávání kmenů *Penicillium chrysogenum* Thom.

Vynález se týká způsobu získávání kmenů *Penicillium chrysogenum* Thom. se zvýšenou produkcí penicilinu a se sníženou produkční variabilitou, a to dlouhodobým působením p-fluorfenylalaninu.

p-Fluorfenylalanin /dále jen PFP/ je látka nejen s mutagenní účinností, ale i látka s účinky haploidizačními při parasexuální hybridizaci. Mutagenní působení analogů aminokyselin a tedy i PFP bylo sledováno jak u prokaryontních, tak u eukaryontních organismů, přičemž byl nalezen významný rozdíl mezi účinkem PFP na obě tyto skupiny. Eukaryontní organismy byly k tomuto mutagennímu působení analogů aminokyselin senzitivní, zatímco účinek na organismy prokaryontní je velmi nízký, a to pouze za určitých podmínek. Mutagenní účinek PFP na eukaryontní organismy je vysvětlován na základě sterické analogie PFP s aminokyselinou fenylalaninem, která je podle této teorie v aktivním místě replikačního enzymu.

Uvedené poznatky využívá způsob získávání kmenů *Penicillium chrysogenum* Thom. se zvýšenou produkcí penicilinu a se sníženou produkční variabilitou, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se výchozí kmen *Penicillium chrysogenum* Thom. nechá vysporulovat v tuhém sporulačním médiu obsahujícím p-fluorfenylalanin v koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ až $1 \cdot 10^{-5}$ M, s výhodou $1 \cdot 10^{-4}$ až $7,5 \cdot 10^{-4}$ M.

Účelně se jako výchozího kmene *Penicillium chrysogenum* Thom. používá kmen ozářeného subletální dávkou ultrafialového světla.

p-Fluorfenylalanin jako aktivní látka je přidáván do sporulační půdy po jejím vysterilizování. Kultivace jsou prováděny při 25 °C v termostatu. Po době potřebné k vysporulování /10 až 20 dnů podle použité koncentrace PFP/ je získaná suspenze spor po působení PFP ředěna ředící řadou s koeficientem 10 a vyseta tak, aby mohly být izolované kolonie přeočkovány do sporové generace. Izoláty jsou pak produkčně hodnoceny dvoustupňovou fermentací ve varných baňkách objemu 500 ml plněných fermentační půdou s laktózou nebo sacharózou jako zdroji uhlíku a energie nebo na fermentačních tancích. Množství produkovaného penicilinu je stanov-

váno hydroxamátovou metodou modifikovanou pro použití autoanalyzátoru. Kmeny pro produkci penicilinu V získané způsobem podle vynálezu vykazují produkci penicilinu V o 10 % vyšší ve srovnání s izolátem kontrolním. Současně dochází k výraznému zvýšení produkční stability těchto kmenů ve srovnání s kmeny výchozími. Tyto nově získané kvality kmenů jsou stabilní i v následujících generacích.

Příklady provedení

P ř í k l a d 1

Sporová suspenze výchozího kmene *Penicillium chrysogenum* /produkce penicilinu V 19.300 ± 1 900 j/ml/ byla bez ředění vyseta v koncentraci 10^6 až 10^7 spor/ml na tuhou sporulační půdu obsahující p-fluorfenylalanin v koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ M. Po 10 dnech inkubace při 25 °C byla vysporulovaná kultura smyta sterilní destilovanou vodou a získaná suspenze spor byla naředěna a vyseta na plotny. Izolované a vysporulované kolonie byly přeočkovány do sporové generace a takto získané izoláty byly hodnoceny fermentací v baňkách na rotačních třepacích strojích, přičemž byla sledována nejen vlastní produkce izolátů, ale také jejich produkční variabilita a stabilita.

P ř í k l a d 2

Postup stejný jako v příkladu 1, s tím rozdílem, že výchozí sporová suspenze byla ozářena subletální dávkou UV světla. Zdrojem UV světla byla germicidní lampa 40 W s předřazeným stabilizátorem síťového napětí. 5 ml suspenze spor v destilované vodě bylo ozářeno v Petriho misce o průměru 54 mm. Během ozařování byla suspenze míchána na elektromagnetickém míchadle. Vzdálenost misky od zdroje záření byla 20 cm.

P ř í k l a d 3

Fermentace ve varných baňkách na rotačních třepacích strojích na médiu obsahujícím sacharózu jako zdroj uhlíku a energie. Produkce penicilinu V u izolátů získaných podle příkladu 1 nebo 2 byly hodnocena na půdě tohoto složení /v % hmotn./: sójová mouka 6 %, uhlíčitán vápenatý 0,9 %, thiosíran sodný 0,8 %, sacharosa 0,75 %, sacharóza dávkovaná v průběhu fermentace 13,75 %, fenoxyoctová kyselina 0,665 %, hydroxid sodný /25% roztok/ 0,2 %. Sterilizace 20 min. při 120 °C, pH po sterilizaci je 8,0. Fermentace probíhá při teplotě 25 °C 11 dnů. Vzorčky jsou odebírány v 9., 10. a 11. dni fermentace. Stanovení penicilinu je prováděno hydroxamátovou metodou modifikovanou pro použití autoanalyzátoru.

Produkční srovnání kmenů:

Kontrolní izolát :	19 300 ± 1 890 j PNC V/ml	100,0 % teorie
izolát po PFP 1 :	20 950 ± 680 j PNC V/ml	108,5 % teorie
izolát po PFP 2 :	21 500 ± 850 j PNC V/ml	111,5 % teorie

P ř í k l a d 4

Fermentace ve varných baňkách na rotačních třepacích strojích na médiu obsahujícím laktózu jako zdroj uhlíku a energie. Fermentace jsou prováděny jako v příkladu 3, s tím rozdílem, že složení fermentační půdy je toto /v % hmotn./: sójová mouka 5 %, uhlíčitán vápenatý 0,9 %, thiosíran sodný 0,8 %, fenoxyoctová kyselina 0,66 %, dihydrofosforečnan draselný 0,067 %, laktóza 6 %, pH po sterilizaci je 7,0.

Produkční srovnání kmenů:

Kontrolní izolát :	18 450 ± 1 520 j PNC V/ml	100,0 % teorie
izolát po PFP 1 :	20 150 ± 610 j PNC V/ml	109,2 % teorie
izolát po PFP 2 :	20 300 ± 590 j PNC V/ml	110,0 % teorie

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob získávání kmenů *Penicillium chrysogenum* Thom. se zvýšenou produkcí penicilinu a se sníženou produkční variabilitou, vyznačující se tím, že se výchozí kmen *Penicillium chrysogenum* Thom. nechá vysporulovat v tuhém sporulačním médiu obsahujícím p-fluorfenylalanin v koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ až $1 \cdot 10^{-5}$ M, s výhodou $1 \cdot 10^{-4}$ až $7,5 \cdot 10^{-4}$ M.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako výchozího kmene *Penicillium chrysogenum* Thom. používá kmeně ozářené subletální dávkou ultrafialového světla.