



GRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

244573

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 1/20

(22) Prihlášené 06 09 84

(21) (PV 6725-84)

(40) Zverejnené 16 10 85

(45) Vydané 15 01 88

(75)
Autor vynálezu

OKÁNIK BORIS ing.; ČUNDERLÍKOVÁ ANNA ing.; TICHÁ EDDA;
BUČKO MICHAL ing. CSc.; MIKLÁŠ EMIL ing., BANSKÁ BYSTRICA

(54) Kmeň mikroorganizmu *Acremonium chrysogenum* CCM F-752

1

2

Kmeň mikroorganizmu *Acremonium chrysogenum* CCM F-752 produkujúci cefalosporín C. Kmeň podľa vynálezu bol ústraný pôsobením mutagénov a opakovanými pasívnymi selekciami. Výhodou kmeňa podľa vynálezu je zvýšená produkcia cefalosporínu C (2×), schopnosť udržať si vysokú produkčnú rýchlosť pri predĺženej kultivačnej dobe a schopnosť produkovať cefalosporín C na produkčných pôdach neobsahujúcich metionín.

Vynález sa týka kmeňa mikroorganizmu *Acremonium chrysogenum* CCM F-752 (interné pracovné označenie BB-IV/82-D), produkujúceho cefalosporín C.

Tento kmeň bol získaný z kmeňa *Acremonium chrysogenum* ATCC 48272 pôsobením mutagénov a opakovanými pasívnymi selekciami.

Produkčné kmene používané v súčasnosti pre výrobu cefalosporínu C produkujú pri submerznej fermentácii do fermentačného média okolo 12 000 μg cefalosporínu C pri kultivačnej dobe 120 až 180 hodín. Rozhodujúcou cestou pri zvyšovaní výroby a zlepšovaní jej rentability je zvyšovanie produkcie pomocou nových, vyššieprodukčných výrobných kmeňov. Pri nových kmeňov získaných aktívnou a pasívnou selekciou je výhodné sa orientovať na kmene, ktoré dosahujú vyššiu produkciu v časovej jednotke, alebo na kmene, ktoré si udržia produkčnú rýchlosť cefalosporínu C i pri predĺženej kultivačnej dobe.

Uvedené prednosti má i nový kmeň mikroorganizmu *Acremonium chrysogenum* podľa vynálezu, uložený v Československej zbierke mikroorganizmov Univerzity J. E. Purkyně v Brne, pod označením CCM F-752 (pracovné označenie BB-IV/82-D).

Výhodou nového kmeňa je zvýšená produktivita cefalosporínu C, ktorá dosahuje až vyše dvojnásobku produkcie doterajších kmeňov.

Významnou vlastnosťou kmeňa je schopnosť udržať si vysokú produkčnú rýchlosť pri predĺženej kultivačnej dobe.

Ďalšou, ekonomicky významnou vlastnosťou kmeňa je jeho schopnosť produkovať cefalosporín C na produkčných pôdach neobsahujúcich metionín. Pri doteraz známych kmeňoch bol metionín rozhodujúcou a určujúcou zložkou živných pôd pre produkciu cefalosporínu C.

Pri šľachtení produkčných kmeňov sa dnes používajú už bežne známe postupy, kombinujúce aktívne mutagénne zásahy s pasívnou selekciou. Z najznámejších mutagénnych činidiel sa používajú ultrafialové žiarenie, nitrózometylmočovina, N-yperit, akriflavín a ďalšie buď samostatne, alebo v kombináciach. Ďalej sa tieto zásahy kombinujú tiež pasážovaním kultúry na pôdach s prídavkom vhodných, špecifických činidiel.

Nový kmeň podľa vynálezu bol taktiež získaný a vyizolovaný použitím týchto postupov.

Základným výchozím materiálom pre šľachtiteľský proces bol kmeň ATCC 48272, na ktorý sme pôsobili striedavo UV svetlom a nitrózometylmočovinou. Vybrané izoláty boli ďalej podrobené pasážovaniu cez média so zníženým, až nulovým obsahom metionínu. Po opätovnom použití UV svetla a ďalším pasážovaním boli získané izoláty, ktoré boli podrobené overovaniu ich vlastností z hľadiska vhodnosti priemyselného použitia.

Zároveň týchto prác bol vybraný kmeň, na ktorý uplatňujeme patentový nárok.

Pri stanovovaní produkcie cefalosporínu C boli použité štandardné metódy biologické za použitia testovacích kmeňov *Bacillus subtilis* a *Alcaligenes faecalis*, ďalej metóda spektrofotometrická a metóda vysokotlakové, kvapalinovej chromatografie.

Nový kmeň má s pôvodným kmeňom rovnaké niektoré znaky. Pri monospórickom rozseve na peptónovej sporulačnej pôde vytvára okrúhle kolónie priemeru 6 až 8 mm. Po 13 až 15 dňoch sú kolónie vysporulované. Majú bielu farbu s nádychom do žltá, krémová. Stárnutím farba postupne prechádza do krémovej. Kolónie sú radiálne, nepravidelne zvráskavené, v strede sa zvyšujú do mierneho špica. Na iných typoch sporulačných pôd je doba nárastu predĺžená a kolónie nemajú všetky charakteristické znaky. Pri submerznej kultivácii sú vlákna v štádiu pomnožovania tenké, dlhé, niekedy vytvárajú zhluky. V produkčnom štádiu sa postupne skracujú až do guľovitých foriem.

Bežné formy dlhodobého uchovávaní kmeňa nie sú veľmi účinné. Lyofilizáciou konzervovaná kultúra si zachováva klíčivosť spór najviac tri mesiace, po tejto dobe táto forma uchovávaní nezaručuje ďalšiu životnosť kultúry. Jednoznačné a reprodukovateľné výsledky pri uchovávaní kmeňa dáva metóda permanentnej selekcie monospórickým výberom z vysporulovanej kultúry starej 3 až 4 týždne.

Podobne ako materský kmeň je vegetatívna forma submerznej kultivácie náročná na dostatočnú koncentráciu rozpusteného kyslíka v živnej pôde. Ak nie je zabezpečený dostatočný prenos kyslíka do pôdy a jeho koncentrácia poklesne k hodnotám blízkym nule, rast a produkcia kultúry sa zastaví.

Veľmi významnou vlastnosťou kmeňa je, že jeho produkcia cefalosporínu C nie je podmienená prítomnosťou metionínu.

Príklad 1

Inokulačná pôda v baničkách sa naočkovala spórovou suspenziou a kultivovala sa pri 28 °C na rotačnom trepacom stroji 47 hodín. Takto pripraveným vegetatívnym inokulom sa naočkovali produkčné baničky so živnou pôdou obsahujúcou kukuričný výluh, arašidový múku, glukózu, škrob, uhličitan vápenatý, soli a sójový olej. Kultivácia na rotačnom trepacom stroji prebiehala pri teplote 25 °C po dobu 144 hodín a bola dosiahnutá produkcia cefalosporínu C 15,560 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Príklad 2

Fermentácia cefalosporínu C prebiehala v laboratórnych fermentačných tankoch obsahu 20 litrov. Vegetatívne inokulum sa pri-

pravidlo taktiež na tomto zariadení na pôde obsahujúcej ako hlavné zložky kukuričný výluh, sacharózu, octan amónny, uhličitan vápenatý a sójový olej. Nárast inokula bol ukončený v 69. hodine kultivácie. Inokulum v množstve 10 % bol naočkovaný produkčný tank so živnou pôdou obsahujúcou

ako hlavné zložky kukuričný výluh, sójový olej, uhličitan vápenatý a zmes solí. V priebehu kultivácie bol pridávaný sójový olej, síran amónny a čpavková voda. Za 151 hodín kultivácie sa dosiahla produkcia 26,920 $\mu\text{g/ml}$ cefalosporínu C.

PREDMET VYNÁLEZU

Kmeň mikroorganizmu *Acremonium chrysogenum* CCM F-752 produkujúci cefalosporín C.