



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

220217
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 1/14

(22) Přihlášeno 03 07 81
(21) (PV 5176-81)

(40) Zveřejněno 25 06 82

(45) Vydáno 15 11 85

(75)
Autor vynálezu

MATELOVÁ VLASTA dr., ROZTOKY u Prahy, ZELENÝ KAREL dr.,
ČULÍK KAREL dr., ULBERT STANISLAV ing., PILÁT PETR ing., PRAHA,
HOFBAUER HENRICH ing., MIKLÁŠ EMIL ing., BUČKO MICHAL ing.,
OKÁNIK BORIS ing., BANSKÁ BYSTRICA

(54) Kmen mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* CCM F-713

1

2

Vynález se týká nového kmene *Penicillium chrysogenum* CCM F-713, produkujícího penicilin G a V. Nový kmen byl získán z používaného produkčního kmene kombinací působení mutagenů (p-fluorfenylalanin a UF-světlo) s pasivní selekcí.

Vynález se týká kmene mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* CGM F-713, produkujícího penicilin G a V.

Tento kmen byl získán z kmene *Penicillium chrysogenum* evidenčního čísla 65/41, získaného z n. p. Biotika, působením mutagenů a opakovanými pasivními selekcemi. Použitý mutagen PFP (DL-p-fluorfenylalanin, Calbiochem) byl aplikován následujícím způsobem: Suspense spor připravená obvyklou cestou byla neředěná vyseta na Petriho misky se sporulační půdou [melasa, glycerin, kvasniční extrakt a soli] s přidaným PFP v koncentracích $1 \cdot 10^{-4}$ až $7,5 \cdot 10^{-4}$ M. Petriho misky byly inkubovány při teplotě 25 °C. Po vysporulování byly spory smyty sterilní destilovanou vodou s kapkou Tweenu 80 a byl proveden rozsev na Petriho misky se shodnou sporulační půdou bez mutagenu tak, jak je prováděna pasivní selekce.

Použitý mutagen UV-světlo. Použitým zdrojem UV-světla byla germicidní lampa 40W s předřazeným stabilizátorem síťového napětí o výkonu 250 W a citlivosti 1%. 5 ml suspense spor ve vodě bylo ozářeno v Petriho misce o průměru 45 mm. Během ozáření byla suspense míchána na elektromagnetickém míchadle. Vzdálenost misky od zdroje záření byla 20 cm, ozáření bylo ve vhodných časových intervalech přerušováno odebíráním 0,5 ml vzorků, které byly ředěny a vysévány na Petriho misky se shodnou sporulační půdou tak, jak je popsáno u postupu pro pasivní selekci.

Spory pro pasivní selekci byly suspendovány v destilované vodě nebo fyziologickém roztoku, ředěny ředící řadou s faktorem 10 a očkovány na Petriho misky se shodnou sporulační půdou. Z jednotlivých ředění bylo paralelně očkováno několik misek. Po 7 až 10denní inkubaci při teplotě 25 °C byly izoláty vysporulovány a bylo možné je přeočkovat na šikmé agary se shodnou sporulační půdou. Inkubace tohoto materiálu probíhala rovněž při teplotě 25 °C po dobu 6 až 8 dní.

Výše uvedeným způsobem střídání mutagenů s pasivní selekcí byl získán izolát UV XLIV/347-36.

```

65/41
↓ FFP + selekce
PFP XI/264
↓ UV
UV XLIV/347
↓ selekce
UV XLIV/347-36

```

Izoláty byly hodnoceny dle následujícího schématu:

```

izolovaná kolonie na Petriho misce
↓
šikmý agar
↓
vegetativní inokulum
↓
vlastní fermentace

```

Izoláty byly hodnoceny dvakrát před lyofilizací, tj. před konzervací, po lyofilizaci dvakrát až třikrát. Lyofilizované kultury slouží k dlouhodobému uchování.

Stanovení účinnosti penicilinu bylo prováděno hydroxamátovou metodou.

Tímto hodnotícím systémem byl získán nový kmen podle vynálezu.

Kmen tvoří při monosporickém rozsevu na spolurační půdě typu glycerin — melasa kolonie velikosti 10 až 15 mm během 7 až 10 dnů kultivace při 25 °C. Kultura dobře a rychle sporuluje na různých typech spoluračních půd i na přírodních substrátech, jako je proso, ječmen, kukuřice, rýže apod. Barva vysporulované kultury je sytě béžová. Kmen na přírodních substrátech je stabilní několik měsíců. Jeho růstové schopnosti jsou mimořádné. Již za 24 hodin dosahuje při submersní přípravě vegetativního inokula takového množství myceliární hmoty jako jiné kmeny za 48 hodin, právě tak při vlastní fermentaci je požadované koncentrace biomasy pro zahájení biosyntézy dosaženo o 24 až 48 hodin dříve než u jiných kmenů.

Další předností kmene je jeho tolerance k vysokým koncentracím penicilinu v půdě. Modelové přidání 30 000 j./ml penicilinu na počátku fermentace do půdy neovlivní biosyntézu penicilinu, 50 000 j./ml penicilinu je únosných jako přídavek ve 48. hodině nebo později. Při tomto obsahu penicilinu v půdě není ještě snížena biosyntetická schopnost kmene.

Kmen má další důležitou vlastnost spočívající v minimální citlivosti na železo. U produkčních kmenů bývá obvyklé snížení výťažnosti při obsahu železa v půdě 50 gamma/ml, které se vyskytuje v železných výrobních tancích, o 25 %, u tohoto kmene je snížení výťažnosti penicilinu pouze o 8 %.

Důležitou předností kmene je jeho tolerance k velkému mechanickému namáhání v průběhu fermentace. I při velice drastickém způsobu míchání dochází k minimálnímu uvolňování nukleotidů z buněk, čili nedochází k poškození myceliárních vláken.

Dále je třeba konstatovat, že účinnost penicilinu dosahovaná ve filtrátu se elucí zbylého sedimentu zvýší o 30 % a desintegrací mycelia o dalších 10 %.

Příklad 1

Vegetativní inokulum bylo připravováno submersně v 500 ml varných baňkách se 60 ml inokulační půdy, která obsahuje základní živiny, tj. zdroj uhlíku sacharózu, dusíku, kukuřičný extrakt a síran amonný a soli. Půda pro přípravu vegetativního inokula byla zaočkována kličkou spor ze šikmého agaru a inkubována na rotačním třepacím stroji 32 až 36 hodin.

Takto připraveným vegetativním inokulem byly očkovány fermentační baňky obsahu 500 ml, objem fermentační půdy 40 ml.

Zdrojem uhlíku byla laktóza a glukóza, zdrojem dusíku kukuřičný extrakt, sójová mouka a amonná sůl, půda dále obsahovala prekurzor postranního řetězce, soli, uhlíkatý vápenatý k pufrování půdy a zdroj síry.

Příprava vegetativního inokula i vlastní fermentace probíhaly na rotačních třepacích strojích při 230 obr./min., výšřednost 25 mm, při teplotě 25 °C.

Fermentace probíhaly 7 dnů, vzorky pro stanovení účinnosti byly odebrány v 5., 6. a 7. dnu fermentace. Maximální produkce bylo zpravidla dosaženo v 6. dnu fermentace.

Produkční srovnání kmenů:

kmen	penicilin V j/ml	penicilin G j/ml
UV XLIV/347	19 000	20 000
UV XLIV/347-36 (CCM F-713)	23 000	24 000

Příklad 2

Fermentace v poloprovozních tancích, objem 250 litrů, byla prováděna třístupňově, předočkovací půda obsahovala jako zdroj uhlíku sacharózu, zdrojem dusíku byl kukuřičný extrakt a anorganický zdroj dusíku, dalšími složkami půdy byly soli a křída. Inokulační půda obsahovala jako zdroj uhlíku sacharózu, zdrojem dusíku byl alkalický eluát arašidové mouky, dále křída a soli. Zdrojem uhlíku ve fermentační půdě byla sacharóza, zdrojem dusíku alkalický eluát arašidové mouky, další složkou půdy je příslušný prekurzor postranního řetězce, zdroj síry, křída a další soli.

V průběhu fermentace je půda doplňována zdrojem uhlíku sacharózou, zdrojem dusíku síranem amonným a močovinou, prekurzorem a fosfátem.

Předočkovací tank o objemu 200 litrů je plněn 100 litry předočkovací půdy, inokulace je provedena kulturou vyrostlou na cca 88 g krup, teplota kultivace je 25 °C, míchání 350 ot./min., vzdušnění 100 litrů/min., doba kultivace 36 hodin.

Očkovací tank o objemu 250 litrů, plnění 150 litrů inokulační půdy byl očkovan 10 % inokula z předočkovacího tanku, teplota kultivace 25 °C, míchání 30 ot./min., vzdušnění 150 lt/min., doba kultivace 36 hodin.

Fermentační tank objemu 250 litrů byl plněn fermentační půdou, 150 litrů. Inokulace byla provedena 10 % vegetativního inokula, teplota při fermentaci 25 °C, míchání 320 ot./min., vzdušnění 150 až 190 litrů/min., doba fermentace 150 až 222 hodiny.

Během fermentace byly kontinuálně nebo semikontinuálně přidávány roztoky sacharózy, dusíkaté směsi s doplňujícím množstvím prekurzoru a fosfátu, zvětšující se objem fermentační půdy a růst mycelia byly kompenzovány odběry půdy a příslušným ředěním. Takto řízenou fermentací bylo dosaženo na konci fermentace, tj. cca ve 222 hodině až 40 000 j./ml, při tom v jednotlivých odtazích fermentační půdy byla účinnost penicilinu od 14 000 j./ml v prvním až po 34 000 j./ml v posledním odtahu. Odtahů je během fermentace cca 10 po 10 litrech. Tento kmen vzhledem k vynikajícím růstovým schopnostem umožňuje aplikaci výše uvedené zředovací technologie a tím dosažení podstatného zvýšení výtěžků jak v j./ml, tak v mia na daný objem fermentační půdy.

Kmen *Penicillium chrysogenum*, značený UV XLIV/347-36 byl uložen v Čs. sbírce mikroorganismů (Czechoslovak Collection of Microorganisms), Universita J. E. Purkyně, Brno, Tř. obránců míru 10, pod číslem CCM F-713.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Kmen mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* CCM F-713, produkující penicilin V a G.