



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

262188

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 12. N 1/14

(22) Přihlášeno 06 10 87
(21) (PV 7167-87.C)

(40) Zveřejněno 15 07 88

(45) Vydáno 15 06 89

(75)

Autor vynálezu

MATELOVÁ VLASTA RNDr. CSc., ROZTOKY u Prahy, ÚLEHLOVÁ
MIROSLAVA ing., PILÁT PETR ing. CSc., PRAHA, BEZDĚK KAREL ing.,
ROZTOKY u Prahy, OKÁNIK BORIS ing., BUČKO MICHAL ing. CSc.,
MIKLÁŠ EMIL ing., BANSKÁ BYSTRICA

(54) Kmen mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* CCM F-8012

1

2

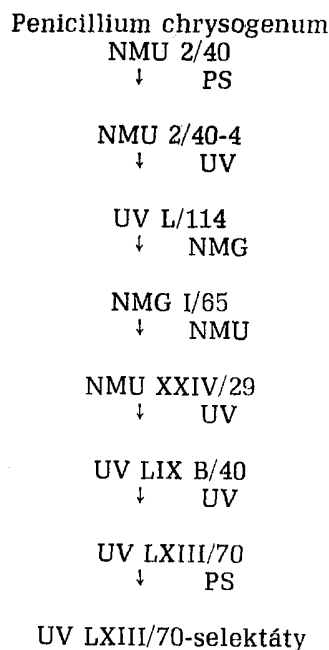
Účelem řešení je získat kmen produkující penicilin ve vyšších koncentracích, než je dosahováno předchozími kmeny, který je odolnější na mechanické namáhání ve srovnání s předchozími kmeny. Penicilin syntetizuje mutant kmene *Penicillium chrysogenum*, získaný po působení vhodných mutagenů a pasívní selekci v médiu obsahujícím vhodný zdroj uhlíku, dusíku, síry, fosforu, prekursoru, protipěnidla, stopových prvků a křídou při vysoké konverzi zdroje uhlíku za aerobních podmínek při 25 °C. V průběhu 168 hodin kultivace kmen vytváří za laboratorních podmínek 33 400 j/ml penicilinu V nebo 30 900 j/ml penicilinu G, v měřítku laboratorních fermentačních tanků vytváří 35 980 j/ml penicilinu V.

Vynález se týká kmene mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* CCM F-8012 a jeho selektátů (interní označení UV LXIII/70) produkujícího penicilin G a V.

Produkce penicilinu je dnes o tři řády vyšší, než byla před 40 lety, kdy začínala jeho výroba. Zásahu o toto zvýšení má mimo rozvoj šlechtitelských metod, jejichž základem je využívání uměle navozované variability biologického materiálu.

Program zvyšování produkce kmenů se opírá o namátkovou selekci uměle indukovaných mutantů pomocí vhodných mutagenů chemických či fyzikálních a testování mutagenizovaných kultur. Okruh použitelných mutagenů se řídí jejich účinky, neboť je třeba eliminovat hromadění nežádoucích odchylných vlastností, které se mohou progresivně kumulovat, může to být zhoršování růstových vlastností, sporulace, ztráta odolnosti na mechanické namáhání atd.

Kmen *Penicillium chrysogenum* CCM F-8012, interního označení UV LXIII/70 byl získán působením mutagenů a pasivní selekcí z výchozího kmene CCM F-760, interního označení NMU 2/40. Postup šlechtění vyplývá z následujícího schématu, ve kterém je znázorněna genealogická linie vedoucí k novému kmenu.



Vysvětlení zkratk:

- UV — působení UV-světla
- NMG — působení nitrosometylguanidinu
- NMU — působení nitrosometylurey
- PS — pasivní selekce

Zdrojem UV-světla byla germicidní lampa Philips TVV 40 W s předřazeným stabilizátorem síťového napětí ST 250 o výkonu 250 V a citlivosti 1%. Suspenze spor ve vodě byla ozařována v Petriho misce. Bě-

hem ozařování byla suspenze míchána na elektromagnetickém míchadle. Vzdálenost misky od zdroje ozaření byla 20 cm, záření bylo ve vhodných časových intervalech přerušováno odebíráním vzorků, které byly dále ředěny a vysévány na Petriho misky se sporulační půdou.

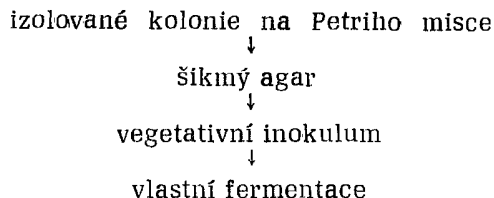
Pro mutagenizaci nitrosometylguanidinem byla používána koncentrace mutagenu 2 mg/ml v konečné mutační směsi. Doba aplikace byla od 15 do 40 minut při míchání v uzavřených Erlenmayerových baňkách, pH mutační směsi bylo pufováno citrofosfátovým puforem o pH 6,0. V časových intervalech byly odebírány vzorky a ředěny až na neúčinnou koncentraci NMG a vysévány na Petriho misky se sporulační půdou.

Nitrosometylurea byla aplikována v konečné koncentraci 6 mg/ml. Sporová suspenze v citrofosfátovém pufru pH 6,0 byla míchána v uzavřených Erlenmayerových baňkách, po přidání mutagenu byly odebírány vzorky ve vhodných časových intervalech, ředěny a vysévány na Petriho misky se sporulační půdou.

Spory pro pasivní selekci byly suspendovány v destilované vodě nebo fyziologickým roztoku, ředěny a vysévány na Petriho misky se sporulační půdou.

Tímto způsobem aplikace mutagenů a pasivní selekcí byl získán izolát UV LXIII/70 a jeho selektáty.

Izoláty byly hodnoceny dle následujícího schématu:



Izoláty byly produkčně hodnoceny ve 2 pokusech, nejlepší byly zlyofilizovány nebo uloženy do kapalného dusíku, po vyočkování byly izoláty opět hodnoceny ve třech pokusech. Konzervy slouží k dlouhodobému uchovávání kmenů a umožňují zachování získaných vlastností.

Stanovení účinnosti penicilinu bylo prováděno automatizovaným systémem při použití hydroxamátové kolorimetrické metody.

Tímto hodnotícím systémem byl získán kmen a jeho selektáty, na který je uplatňován patentový nárok.

Kolonie kmene při monosporickém rozsevu v průběhu 9 dnů dorůstají do velikosti cca 12 mm, střed kolonie je miskovitý, odvalu k okraji jsou kolonie zvrásněné, barva spor je béžová. Kultura dobře a rychle sporuluje na různých typech sporulačních půd a na různých přírodních substrátech jako je rýže, kroupy, proso atd. Počet spor v 1 ml suspenze vzniklé smytím spor z Endovy zkumavky 10 ml vody se pohybuje ko-

lem $3 \cdot 10^7$ a počet spor v 1 ml suspenze vzniklé smytím spor ze 30 g krup 50 ml vody je $9 \cdot 10^7$ spor v ml.

Vegetativní inokulum lze připravovat na půdách obsahujících jako zdroj uhlíku glukózu nebo sacharózu při dosažení shodných růstových hodnot. Vhodným zdrojem dusíku pro přípravu inokula je kukuřičný extrakt. Optimální stáří vegetativního inokula je 36 až 48 hodin, optimální teplota 25 stupňů Celsia.

Maximálních produkcí je s tímto kmenem dosahováno ve fermentační půdě obsahující jako zdroj uhlíku laktózu či sacharózu, nejvhodnějším zdrojem dusíku je Pharmamedia v kombinaci s anorganickým zdrojem dusíku. Dále fermentační půda musí obsahovat zdroj síry, fosforu, hořčík, uhličitán vápenatý, prekursor postranního řetězce penicilinu a protipěnidlo. Optimální teplota pro biosyntézu penicilinu je 25 °C.

Výběr kmenů byl prováděn i s ohledem na odolnost na mechanické namáhání.

Příklad 1

Vegetativní inokulum bylo připravováno submerzní kultivací v 500 ml varných baňkách se 40 ml inokulační půdy (zdroj uhlíku sacharóza, dusíku kukuřičný výluh, síran amonný a anorganické soli). Půda pro

Tabulka

kmen (interní označení)	penicilin V j/ml	penicilin G j/ml
NMU 2/40	32 300	28 600
UVLXIII/70	33 400	30 900

Příklad 2

Fermentační postup byl shodný s postupem uvedeným v příkladu 1 s tím rozdílem, že do části fermentačních baňek byl přidán buď keramický váleček délky 6 mm, šířky 4 mm, nebo skleněná kulička o průměru 4 mm. Keramické válečky byly 4. den fer-

připravu vegetativního inokula byla zaočkována kličkou spor za šikmého agaru se sporulační půdou nebo 2,5 ml sporové suspenze vzniklé smytím krup (30 g) 50 ml destilované vody a inkubována na rotačním třepacím stroji 48 hodin.

Takto připraveným vegetativním inokulem byly očkované 10% fermentační baňky obsahu 500 ml se 40 ml fermentační půdy. Zdrojem uhlíku ve fermentační půdě byla laktóza v kombinaci se sacharózou, zdrojem dusíku Pharmamedia v kombinaci s dusičnanem amonným, dále půda obsahovala zdroj hořčíku, síry, fosforu, prekursor postranního řetězce, uhličitán vápenatý a protipěnidlo. Při biosyntéze penicilinu G byl prekursor přidáván v průběhu fermentace.

Příprava vegetativního inokula i vlastní fermentace probíhaly na rotačních třepacích strojích (230 obr./min., výstředník 25 mililitrů) při 25 °C.

Doba fermentace byla 8 dnů, vzorky na stanovení účinnosti penicilinu byly odebrány v 6., 7. a 8. dni fermentace. Maxima produkce bylo dosaženo v 7. dni fermentace.

Produkční srovnání výchozího kmene s kmenem, na který je uplatňován patentový nárok, je uvedeno v následující tabulce.

Tabulka

dny	standardní		podmínky ve fermentační baňce			
			1. ker. váleček → 4. den odstraněn		1 skleněná kulička	
			k m e n			
	NMU 2/40	UV LXIII/ /70	NMU 2/40	UV LXIII/ /70	NMU 2/40	UV LXIII/ /70
3.	5 500	1 400	3 800	4 000	4 800	5 300
4.	11 300	15 600	2 200	3 500	4 800	8 900
5.	20 500	23 700	1 800	3 200	4 500	12 300
6.	28 000	33 400	1 800	12 300	8 800	19 300
7.	29 500	33 400	2 200	17 800	10 200	23 000
8.	32 200	30 600	2 600	25 300	13 100	26 600

Kmen, na který je uplatňován patentový nárok, podléhá negativnímu vlivu mechanického namáhání minimálně a navíc má značné regenerační schopnosti, jak vyplývá z výsledků uvedených v předchozí tabulce.

Příklad 3

Fermentace penicilinu V byla uskutečněná v čtvrtprovozním měřítku v objemu 20litrových laboratorních fermentačních tanků (v dalším LFT).

Inokulum s kmenem UV LXIII/70 bylo připraveno z provozní ječmenné sporové kon-

zervy též v LFT na standardní inokulační půdě za 32 hodin kultivace.

Fermentace penicilinu V na půdě s obsahem 4% sójové mouky, 1% CSL o sušině 60-procentní, dále prekurzoru, vápence a dalších solí probíhala za obvyklých kultivačních a technologických podmínek za semikontinuálního přidávání dalších živin (sacharóza, síran amonný, sójový olej, fenoxyoctová kyselina) po dobu 211 hodin. Byla dosažena produkce penicilinu V stanovená jodometricky 35 980 mj/ml, což bylo 118,7 % oproti kontrolní fermentaci s kmenem NMU 2/40.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Kmen mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* CCM F- 8012, produkující penicilin V a G.