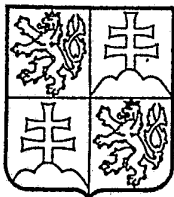


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

273 134

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
C 12 R 1/82
C 12 N 1/14

(21) PV 8424-87.B
(22) Přihlášeno 23 11 87

(40) Zveřejněno 12 07 90
(45) Vydáno 30 12 91

(75) Autor vynálezu

ÚLEHLOVÁ MIROSLAVA ing., PRAHA, MATELOVÁ
VLASTA RNDr.CSc., ROZTOKY U PRAHY, 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 8013

(57) Účelem řešení je získání kmene produkujícího penicilin ve vyšších koncentracích, než jakých je dosahováno předchozími kmeny. Penicilin syntetizuje mutant *Penicillium chrysogenum*, získaný po působení vybraných mutagenů a po pasivních selekcích, v médiu obsahujícím vhodný zdroj uhlíku, dusíku, síry, fosforu a stopových prvků, křídou, prekursor postranního řetězce penicilinu a od-pěnovadlo, při vysoké konverzi zdroje uhlíku, za aerobních podmínek při 25 °C. Tento kmen vytváří v průběhu 168 hodinové kultivace v laboratorních podmínkách 35 300 j penicilinu V na 1 ml.

Vynález se týká kmene mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* CCM 8013 (interního označení UV LXV A/24) produkujícího penicilin V a G a selektátů tohoto kmene.

Produkce penicilinu je v současnosti o tři řády vyšší, než tomu bylo před čtyřiceti lety, kdy výroba penicilinu začínala. Značnou zásluhu o toto zvýšení má rozvoj šlechtitelských metod, jejichž základem je využívání uměle navozované variability biologického materiálu.

Program zvyšování produkce kmenů se opírá o namátkovou selekci mutantů, indukovaných uměle pomocí vhodných chemických či fyzikálních mutagenů, a o testování získaných mutagenizovaných kultur. Okruh používaných mutagenů se vybírá podle jejich účinků tak, aby docházelo ke zvyšování produkce a nedošlo přitom ke zhoršování životaschopnosti mikroorganismu.

Kmen mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* CCM 8013, interního označení UV LXV A/24, byl získán působením mutagenů a pasivní selekcí z výchozího kmene CCM F-760, interního označení NMU 2/40. Postup šlechtění zachycuje následující schéma, kde je znázorněna genealogická linie vedoucí ke kmenu, na nějž je uplatňován patentový nárok.

Penicillium chrysogenum

```
NMU 2/40
  ↓ PS
NMU 2/40-4
  ↓ UV
UV L/114
  ↓ NMG
NMG I/65
  ↓ NMU
NMU XXIV/29
  ↓ UV
UV LIX B/783
  ↓ UV
UV LXV A/24
  ↓ PS
UV LXV A/24-selektáty
```

Vysvětlení zkratk: UV působení UV světla
NMG působení nitrosometylguanidinu
NMU působení nitrosometylurey
PS pasivní selekce

Aplikace mutagenů:

Zdroje UV světla byla germicidní lampa Phillips TUV 40W s předřazeným stabilizátorem síťového napětí ST 250 o citlivosti 1 %. Suspenze spor ve vodě v Petriho misce, míchaná pomocí elektromagnetického míchadla, byla ozařována UV světlem. Vzdálenost misky od zdroje záření byla 20 cm. Ve zvolených intervalech bylo záření přerušováno, byly odebrány vzorky a po příslušném naředění vysévány na Petriho misky se sporulační půdou.

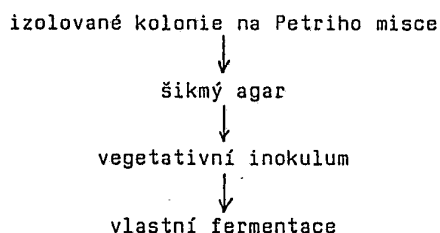
Pro mutagenizaci nitrosometylguanidinem byla používána koncentrace mutagenu 2 mg/ml ve výsledné mutační směsi. Doba aplikace mutagenu se pohybovala mezi 15 až 45 minutami. Směs byla míchána na elektromagnetickém míchadle v Erlenmeyerových baňkách chráněných proti přístupu světla, pH mutační směsi bylo stabilizováno citrofosfátovým puřem o pH 6,0. V časových intervalech byly odebrány vzorky, ředěny na neúčinnou koncentraci mutagenu a vysévány na Petriho misky se sporulační půdou.

Nitrosometylurea byla aplikována v konečné koncentraci 6 mg/ml. Mutagenizovaná sporová suspenze v citrofosfátovém pufru o pH 6,0 byla míchána elektromagnetickým míchadlem v Erlenmeyerových baňkách chráněných před přístupem světla, ve vhodných časových intervalech byly odebírány vzorky a po naředění vysévány na Petriho misky se sporulační půdou.

Pro pasivní selekci byly spory resuspendovány v destilované vodě nebo ve fyziologickém roztoku, naředěny a vysévány na Petriho misky se sporulační půdou.

Tímto způsobem aplikace mutagenů a pasivní selekcí byl získán izolát UV LXV A/24 a jeho selektáty.

Izoláty byly hodnoceny podle následujícího schématu:



Izoláty po mutagenních zásazích či po pasivní selekci byly produkčně hodnoceny ve dvou pokusech, nejlepší byly zlyofilizovány nebo uloženy do kapalného dusíku. Po vyočkování konzerv byly izoláty opětovně hodnoceny ve třech pokusech. Konzervace slouží k dlouhodobému uchovávání kmenů a umožňuje zachování získaných vlastností.

Stanovení penicilinu bylo prováděno automatizovaným systémem založeným na použití hydroxamátové kolorimetrické metody.

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

Kolonie kmene při monosporickém rozsevu dorůstají v průběhu 9 dní velikosti cca 11 mm v průměru, střed kolonie je tvořen miskovitou prohlubní, mezi vrcholem valu a okrajem jsou kolonie zvrásněné. Barva spor je béžová. Kultura dobře a rychle sporuluje na různých typech sporulačních půd i na přírodních substrátech, jako jsou kroupy, rýže, proso apod. Počet spor v 1 ml suspenze vzniklé smytím spor z Endovy zkumavky 10 ml vody se pohybuje kolem 10^7 a počet spor v 1 ml suspenze vzniklé smytím spor ze 30 g krup 50 ml vody je $5 \cdot 10^7$.

Vegetativní inokulum lze připravit na půdách obsahujících jako zdroj uhlíku sacharózu nebo glukózu. Vhodným zdrojem dusíku pro přípravu inokula je kukuřičný extrakt. Optimální stáří vegetativního inokula je 36 až 48 hodin, optimální teplota je 25 °C.

Nejvyšších produkcí je s tímto kmenem dosahováno ve fermentační půdě obsahující laktózu či sacharózu jako zdroj uhlíku. Nejvhodnějším zdrojem dusíku je bavlníková mouka v kombinaci s anorganickým zdrojem dusíku. Dále musí půda pro fermentaci obsahovat zdroj síry, fosforu a hořčíku, uhličitán vápenatý, prekursor postranního řetězce penicilinu a odpěňovadlo. Teplota optimální pro biosyntézu penicilinu je 25 °C.

Příklad

Vegetativní inokulum bylo připraveno submerzní kultivací kmene v 500 ml varných baňkách se 40 ml inokulační půdy, obsahující sacharózu jako zdroj uhlíku, kukuřičný výluh jako zdroj dusíku, síran amonný a další anorganické soli. Půda pro přípravu vegetativního inokula byla zaočkována klíčkovou sporou ze šikmého sporulačního agaru nebo 2,5 ml sporové suspenze, vzniklé smytím 30 g krup 50 ml destilované vody, a inkubována na rotačním třepacím stroji 48 hodin.

Takto připraveným vegetativním inokulem byly v poměru 1:10 očkovány fermentační baňky o objemu 500 ml obsahující 40 ml fermentační půdy. Jako zdroj uhlíku ve fermentační půdě sloužila laktóza v kombinaci se sacharózou, jako zdroj dusíku bavlníková mouka v kombinaci s dusičnanem amonným. Dále půda obsahovala zdroj hořčíku, síry, fosforu, prekursor postranního řetězce, uhličitan vápenatý a odpěňovadlo.

Příprava vegetativního inokula i vlastní fermentace probíhaly na rotačních třepacích strojích (230 obrátek za minutu, výstřednost 25 mm) při 25 °C.

Doba fermentace byla 8 dnů, vzorky pro stanovení penicilinu byly odebírány v 6., 7. a 8. dnu fermentace. Maxima produkce bylo dosahováno v 7. dnu fermentace.

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

interní označení kmene	penicilin V (j/ml)
NMU 2/40	32 300
UV LXV A/24	35 300

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Kmen mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* CCM 8013, vyznačující se tím, že produkuje penicilin V a G a selektáty tohoto kmene.