



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

243785
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 1/14

(22) Prihlášené 01 12 83
(21) (PV 8801-83)

(40) Zverejnené 17 09 85

(45) Vydané 15 01 88

(75)

Autor vynálezu

WELWARD LADISLAV ing. CSc.; POTANČOKOVÁ MARTA, BANSKÁ
BYSTRICA; FRIMM RICHARD doc. ing. CSc., BRATISLAVA; MARTVOŇ
AUGUSTÍN doc. ing. CSc., MODRA; KOŠALKO RUDOLF ing. CSc.,
BRATISLAVA; RAKYTA JÁN ing. BANSKÁ BYSTRICA; ROLKO PAVEL
ing., NITRA; DUDEK MARCEL ing., BANSKÁ BYSTRICA

[54] Kmeň mikroorganizmu *Acremonium chrysogenum* CCM F-750

1

2

Vynález sa týka kmeňa mikroorganizmu *Acremonium chrysogenum* CCM F-750 produkujúceho cefalosporín C [ďalej CFS-C]. Tento kmeň bol získaný z kmeňa *Acremonium chrysogenum* CCM F-729 šľachtením zameraným na zvýšenie produkcie cefalosporínu C.

Vynález sa týka kmeňa mikroorganizmu *Acremonium chrysogenum* CCM F-750 produkujúceho cefalosporín C (ďalej CFS-C). Tento kmeň bol získaný z kmeňa *Acremonium chrysogenum* CCM F-729 šľachtením zameraným na zvýšenie produkcie cefalosporínu C. Východzí kmeň dosahoval v tančíku súhrnú aktivitu 9 200 ug/ml, z toho však len cca 1/3 tvoril požadovaný CFS-C, zbytok bol dezacetylcefalosporín C (D-CFS-C) a cefalosporín C_x (CFS-C_x).

Popisovaný kmeň mikroorganizmu *Acremonium chrysogenum* CCM F-750 bol získaný tak, že materský kmeň CCM F-729 bol vystavený mutagénemu šľachteniu — striedavo UV svetlu a N-nitrozometylbiuretu s preferenciou izolátov rezistentných na feed back kontrolu syntézy antibiotika-inhibíciu koncovým produktom CFS-C.

Šľachtenie bolo robené tak, že vysporulovaná kultúra rodičovského kmeňa na šikmom agare v Endovej skúmavke na sporulačnej pôde NB-II sa zmyla 10 ml sterilnej vody, prefiltrovala cez vatovú zátku na pipete za účelom oddelenia hýf a artrospór od konídií. Z takejto suspenzie konídií vhodne nariadenej sa očkovali Petriho misky s pôdou NB-II, ktorá má toto zloženie. Bacto Beef extrakt 0,3 %, bacto peptone 0,5 %, glukóza 1 %, FeSO₄ · 7H₂O 0,005 %, MgSO₄ · 7H₂O 0,005 %, D,L-metionín 0,005 %, L-cysteín 0,005 %, agar Difco 2,5 %.

Mutagénny zásah sa robil pomocou UV-svetla germicídnu UV-lampou Phillips TUV 30 W s rozdelením spektrálnej energie-vlnová dĺžka 253,7 nm až 93,5 %, ostatné vlnové dĺžky 6,5 %. Vzdialenosť misky od zdroja žiarenia bola 30 cm. Po ožiarení sa misky okamžite preniesli do inkubátora na teplotu 28 °C, kde sporulovali 11 dní. Vysporulované kolónie boli za aseptických podmienok izolované a prenesené na šikmý agar pôdy NB-II.

Ďalší mutagénny zásah chemicky sa robil tak, že k suspenzii o konc. 10⁵–10⁶ konídií/ml sa pridal N-nitrozometylbiuret o koncentrácii 0,4 %. Mutagén bol v kontakte s kultúrou počas 1 hodiny na trepacom stroji (4 Hz) pri teplote 27 °C. Po expozícii boli zo

zmesi mutagén-kultúra pripravené riedenia 10⁻² až 10⁻³ konídií/ml. Šľachtenie prebiehalo bez prístupu denného svetla, sporulácia na Petriho miskách trvala pri teplote 27 °C 11 dní. Jednotlivé kolónie boli po zásahoch asepticky prenesené na šikmý agar NB-II a odskúšané na produkčnú aktivitu v baničkovom výbere.

Ako pomnožovacia submerzná pôda sa použila pôda IP-5 o zložení: sacharóza 1,5 %, octan amónny 0,5 %, metyloléat 0,08 %, kukuričný výluh (100%-ný). Po 72hodinovej kultivácii na rotačnom trepacom stroji 4 Hz pri teplote 27 °C sa získalo vegetatívne inokulum. Z narasteneho inokula sa 4 ml očkovali 500 ml varné banky plnené 40 ml pôdy PP-O. Produkčné pôdy mali nasledovné zloženie: škrob kukuričný 5 %, arašidová múka 6 %, sacharóza 0,5 %, glukóza 1,25 percent, CaCO₃ 1,0 %, D,L-metionín 0,2 %, borax 0,0 %, zmes repkový a sójový olej 2,5 percent, (NH₄)₂SO₄ 1,0 %, Csl. (100%-ný) 0,5 %.

Šľachtený kmeň sa po skončení kultivácie na trepacom stroji na pôde PP-O ponechal vplyvu vlastných metabolitov staticky pri laboratornej teplote 5–7 dní. Hladina hlavného metabolitu CFS-C sa pri tomto pasážovaní postupne upravovala až na hodnoty 25 000 µg/ml. Po uvedenej dobe sa urobil monokolóniový rozsev na Petriho misky s pôdou NB-II a v screeningu sa vybral najproduktívnejší jedinec na pôde PP-O.

Morfológia kmeňa je nasledujúca: získaný kmeň CCM F-750 tvorí na sporulačnej pôde NB-II vrásčité kolónie krémovej farby o priemere kolónií cca 2–5 mm. Na pôde MPA o zložení, mäsový výťažok 1 %, zmes peptónov 1 %, NaCl 0,5 %, agar 1,5 % sú kolónie väčšie od 3 do 7 mm nepravidelného tvaru, krémovej farby.

Po biochemickej stránke sa získaný kmeň vyznačuje tým, že oproti iným kmeňom *Acremonium chrysogenum* je potreba metionínu v submerznej fermentácii len 0,05–0,3 percent podľa stupňa aerácie.

Produkčná aktivita kmeňa je v baničkách 10 200 ug/ml a v tančíku 22 400 ug/ml CFS-C.

PREDMET VYNÁLEZU

Kmeň *Acremonium chrysogenum* CCM F-750 produkujúci cefalosporín C.