



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

**240247**  
(11) (B1)

[51] Int. Cl.<sup>4</sup>  
C 12 N 15/00

(22) Přihlášeno 06 11 84  
(21) (PV 8440-84)

(40) Zveřejněno 13 06 85

(45) Vydáno 15 06 87

(75)  
Autor vynálezu

VOJTÍŠEK VLADIMÍR RNDr. CSc.; HUŇKOVÁ ZDENKA RNDr. CSc.;  
KRUMPHANZL VLADIMÍR prof. DrSc., PRAHA;  
JAKUBOVÁ ANTONIA ing.; BUČKO MICHAL ing. CSc.;  
MIKLÁŠ EMIL ing., BANSKÁ BYSTRICA; BARTA MIROSLAV RNDr.;  
ČULÍK KAREL RNDr., PRAHA

(54) Způsob selekce a nahromadování mikroorganismů hydrolyzujících fenoxymethylpenicilin na 6-aminopenicilánovou kyselinu a kmen mikroorganismu *Cryptococcus* sp. CCY 17-22-1

1

2

Řešení se týká způsobu selekce a nahromadování mikroorganismů hydrolyzujících fenoxymethylpenicilin na kyselinu 6-aminopenicilánovou a je vyznačen tím, že se kultury mikroorganismů naočkují do selektivního média, kde jako jediný zdroj asimilovatelného dusíku, a/nebo jak dusíku, tak uhlíku slouží fenoxycetamid, 3-fenylpropionamid, 4-hydroxyfenoxycetamid, fenylakrylamid, a/nebo, kde jako jediné zdroje asimilovatelného uhlíku slouží soli kyseliny 3-fenylpropionové, fenylakrylové, fenoxycetové a 4-hydroxyfenoxycetové, popřípadě s amidy těchto kyselin, sloužících jako jediné zdroje asimilovatelného dusíku, nebo s anorganickým zdrojem dusíku, výhodně s amonnými ionty, přičemž vyrostlé kultury mikroorganismů se v těchto půdách pasážují tak dlouho, až se nezvyšuje růstová rychlost, načež se vyrostlá kultura vyočkuje a konzervuje.

Vynález se rovněž týká kmene mikroorganismu *Cryptococcus* sp., CCY 17-22-1 produkujícího vnitrobuněčnou V-penicilin amidázu, která přednostně hydrolyzuje fenoxymethylpenicilin na 6-aminopenicilánovou kyselinu.

Vynález se týká způsobu selekce a nahromadování kmenů mikroorganismů hydrolyzujících fenoxymethylpenicilin na 6-aminopenicilánovou kyselinu a kmene mikroorganismu *Cryptococcus* sp. CCY 17-22-1.

Je známo, že kyselina 6-aminopenicilánová (dále jen 6-APK) slouží jako meziprodukt pro výrobu tzv. polosyntetických penicilinů, např. ampicilinu. 6-APK lze připravit z přírodních penicilinů, tj. z benzylpenicilinu (G-penicilinu) nebo fenoxymethylpenicilinu (V-penicilinu), buď chemicky, nebo enzymovou hydrolyzou. Chemická hydrolyza přírodních penicilinů je ekonomicky nevýhodná. Naproti tomu enzymová hydrolyza má podstatně lepší ekonomické parametry, čehož je využíváno pro výrobu 6-APK řadou zahraničních farmaceutických firem.

Ve většině případů ve světě, a rovněž i v Československu, je 6-APK vyráběna enzymovou hydrolyzou benzylpenicilinu. K tomuto účelu byly získány vysokoprodukční kmeny bakterií syntetizující vysoké množství enzymu G-penicilin amidázy, např. kmeny *Escherichia coli* podle čs. autorských osvědčení č. 162 274 a 188 631.

Fenoxymethylpenicilin (V-penicilin) je však enzymově hydrolyzován bakteriálními kmeny jen velmi vzácně. Např. bylo popsáno pouze několik kmenů bakterií z rodů *Erwinia*, *Achromobacte*, *Micrococcus*, *Streptomyces* a *Actinoplanes*, které jsou schopny syntetizovat specifickou V-penicilin amidázu hydrolyzující V-penicilin za vzniku 6-APK. Popisované produkce tohoto enzymu u zmíněných rodů bakterií jsou však velice nízké, u některých druhů je enzym syntetizován extracelulárně (*Streptomyces*), takže tyto kmeny bakterií nemají v podstatě pro výrobu 6-APK průmyslový význam (Vandamme, E. J., *Economic Microbiology, Microbial Enzymes and Bioconversions*, Rose, A. H., ed., Vol. 5, Chapter 9, pp. 467 až 522, Acad. Press, New York, 1980).

Citovaný autor naproti tomu uvádí, že u některých eukaryontních mikroorganismů je výskyt V-penicilin amidázy více rozšířen, zejména u některých kvasinek (např. rody *Torulopsis*, *Zygosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Torula*, *Rhodotorula*), plísní (např. rody *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*) a vyšších hub (např. rody *Pleurotus*, *Bovista*). Nejlepšími producenty V-penicilin amidázy jsou některé kmeny vyšších hub, zejména *Pleurotus ostreatus* a *Bovista plumbea*.

Zvládnutí kultivace těchto organismů ve velkokapacitních fermentorech je pro vysoké náklady na řízení kultivace, složení živné půdy a sterilitu kultury při její dlouhodobé submersní kultivaci (řádově 150 až 200 hodin) značně náročné.

Doposud bylo charakterizováno v základních parametrech jen velmi málo producentů V-penicilin amidáz. Ve většině případů jsou informace uvedeny u plísní a vyšších hub, ojediněle u bakterií a pouze v jednom případě u kvasinek, *Rhodotorula glutinis* var.

*glutinis* (Vandamme, E. J. a Voets, J. P., *Zeit. Allg. Microbiol.* 13, 701—710, 1973). Použitím silně koncentrované suspenze intaktních buněk této kvasinky bylo dosaženo 80 % teoretické konverze 1% (hmota/objem) vodného roztoku draselné soli V-penicilinu na 6-APK (28 °C, pH 6,5, reakční doba 30 hodin).

Postup podle vynálezu spočívá v tom, že lze selektovat suspektní kmeny přírodních a sbírkových mikroorganismů s V-penicilin amidázovou aktivitou v tekutých nebo na pevných chemicky definovaných živných půdách, kde jako jediný zdroj asimilovatelného dusíku a/nebo jak dusíku, tak uhlíku slouží fenoxacetamid, 3-fenylpropionamid, fenylakrylamid (amid skořicové kyseliny) nebo jejich deriváty, přičemž schopnost růstu enzymově aktivních buněk s požadovanou aktivitou je indikována přírůstkem turbidity nebo tvorbou kolonií, popřípadě růstem kmenů v přítomnosti soli kyseliny 3-fenylpropionové, fenylakrylové (skořicové) a fenoxoctové nebo jejich derivátů, které slouží jako jediné zdroje asimilovatelného uhlíku v chemicky definované živné půdě. Jednorázovou selekci a pasážování v živných půdách obsahující tyto sloučeniny a jejich deriváty lze kombinovat se sekvenční selekcí v libovolných kombinacích z hlediska utilizace, indukce a substrátové specifity enzymu. Tak lze např. získat kmény rychle rostoucí na užitkovatelných induktorech syntézy apod.

Jednorázovou a sekvenční selekci, kterým předcházely rozsáhlý screening sbírkových a přírodních izolátů, byl uvedeným způsobem získán kmen mikroorganismu *Cryptococcus* sp. CCY 17-22-1, který je rovněž předmětem vynálezu a jehož vlastnosti, především vysoká specifická aktivita V-penicilin amidázy, intracelulární lokalizace enzymu a nepřítomnost  $\beta$ -laktamázy, dovoluují reálný předpoklad jeho využití k enzymové přípravě 6-APK z V-penicilinu pomocí intaktních buněk oddělených od kultivační kapaliny, imobilizovaných buněk, popřípadě může tento kmen sloužit jako zdroj enzymu pro jeho následnou izolaci a jeho další použití v rozpustné nebo imobilizované formě. Základní morfologické a biochemické vlastnosti předmětného kmene a vlastnosti ve vztahu k základní charakterizaci enzymu u intaktních buněk jsou uvedeny v následujícím souhrnu.

Vlastnosti kmene *Cryptococcus* sp. CCY 17-22-1

Základní vlastnosti kmene

Kvasinka, dobře rostoucí na sladidlovém agaru, tvoří krémové kolonie, polární pučení, světlolomné pouzdro. Při růstu v živných půdách obsahujících rychle asimilovatelné zdroje uhlíku (glukóza) tvoří extra-

celulární silně viskózní polysacharid. Tvorbu extracelulárního polysacharidu lze eliminovat složením živné půdy a poměry C : N. Roste dobře na kukuřičném extraktu, směsích aminokyselin a kvasničném hydrolyzátu. Rovněž roste dobře na chemicky definovaných minerálních živných půdách s vhodným zdrojem uhlíku; jako zdroj dusíku využívá amonné ionty.

Růst na níže uvedených sloučeninách jako

Vlastnosti kmene ve vztahu k V-penicilin amidáze u intaktních buněk

- |                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. lokalizace enzymu:                    | intracelulární;                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 2. přítomnost $\beta$ -laktamázy:        | negativní;                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 3. indukce syntézy enzymu:               | kyselina 3-fenylpropionová (+++), fenylakrylová (++), 4-hydroxyfenoxyoctová (++), fenoxyoctová (+), fenyloctová (—); V-penicilin (+++), G-penicilin (—), ampicilin (—), monoamid kyseliny glutarové (++), fenoxycetamid ( $\pm$ ), 4-hydroxyfenoxycetamid (+), 3-fenylpropionamid (—), amid kyseliny fenylakrylové ( $\pm$ ), fenylacetamid (—); |
| 4. substrátová specifita enzymu:         | V přítomnosti glukózy a sacharózy se enzym nesyntetizuje, i když je přítomen kterýkoliv z induktorů jeho syntézy;                                                                                                                                                                                                                                |
| 5. katabolická represe syntézy enzymu:   | 8,0;                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 6. Optimum pH aktivity enzymu:           | 0,5 až 12,0 $\mu\text{mol}$ 6-APK $\cdot \text{mg}^{-1}$ suché hmoty buněk. Dosažená specifická aktivita závisí na složení živné půdy, kultivačních podmínkách a fyziologickém stavu kultury;                                                                                                                                                    |
| 7. Specifická aktivita intaktních buněk* | Chromatografií na tenké vrstvě celulózy a vysokotlakou kapalinovou chromatografií bylo prokázáno, že při styku intaktních buněk s vodnými roztoky K-soli V-penicilinu, vzniká pouze 6-APK a fenoxyoctová kyselina.                                                                                                                               |
| 8. Produkty enzymové přeměny:            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

\* Jednotka enzymové aktivity V-penicilin amidázy je takové množství enzymu, které katalyzuje hydrolýzu vodného roztoku K-soli V-penicilinu jako substrátu, za vzniku jednoho mikromolu 6-APK v jednom mililitru za jednu hodinu v podmínkách enzymové reakční kinetiky nultého řádu při pH 8,0 a teplotě 37 °C. Rozměr aktivity:  $\mu\text{mol}$  6-APK  $\cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ; rozměr specifické aktivity:  $\mu\text{mol}$  6-APK  $\cdot \text{mg}^{-1}$  suché hmoty buněk. Ke stanovení koncentrace 6-APK byl použit postup uvedený v čs. patentovém spisu č. 116 959.

Podle morfologického, růstového a biochemického chování kultury byl získaný kmen zařazen do rodu *Cryptococcus* v souhlase s taxonomickými kritérii uvedenými v: The Yeasts, A taxonomic study, second edition, J. Lodder, ed., North-Holland Publishing Company — Amsterdam — London, 1970; J. A. Barnett, R. W. Payne and D. Yarrow, Yeasts, Characterization and Identification, Cambridge, London, New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney, 1983. Předmětný produkční kmen mikroorganismu *Cryptococcus* sp. je uložen v čs. sbírce kvasinek (Czechoslovak Collection of Yeasts) v Bratislavě pod č. CCY 17-22-1.

Podstata způsobu jednorázové a sekvenční selekce a nahromadování kmenů mikroorganismů, zvláště kvasinek, hydrolyzujících fenoxymethylpenicilin na 6-aminopenicilánovou kyselinu podle vynálezu spočívá v tom, že se kultury mikroorganismů naočkuje do selektivních chemicky definovaných živných půd, kde jako jediný zdroj asimilovatelného dusíku, a/nebo jak dusíku, tak

jediných zdrojích asimilovatelného uhlíku v tekutých živných půdách.

Glukóza (+), sacharóza (+), fruktóza (+), galaktóza (—), laktóza ( $\pm$ ), glycerol (—), DL-laktát (—), sukcinát (+), citrát (+), ethanol (+), soli kyseliny fenyloctové (—), fenoxyoctové (—), 4-hydroxyfenoxyoctové (—), 3-fenylpropionové (+), fenylakrylové (+).

uhlíku slouží fenoxycetamid, 4-hydroxyfenoxycetamid, 3-fenylpropionamid, fenylakrylamid, a/nebo, kde jako jediný zdroj asimilovatelného uhlíku slouží soli, kyseliny 3-fenylpropionové, fenylakrylové, fenoxyoctové, hydroxyfenoxyoctové, popřípadě s amidy těchto kyselin sloužících jako jediné zdroje asimilovatelného dusíku, nebo s anorganickým zdrojem dusíku, výhodně s amonnými ionty, přičemž vyrostlé kultury mikroorganismů se v těchto půdách pasážují tak dlouho, až se nezvyšuje růstová rychlost, načež se vyrostlá kultura vyočkuje a konzervuje.

Předmětem vynálezu je dále kmen mikroorganismu *Cryptococcus* sp. CCY 17-22-1, který byl získán postupem uvedeným v předchozím odstavci, a který produkuje vnitrobuněčnou V-penicilin amidázu, která přednostně hydrolyzuje fenoxymethylpenicilin na 6-aminopenicilánovou kyselinu.

Vynález je dále doložen v příkladech provedení aniž by se jimi omezoval.

## Příklad 1

22 sbírkových a 8 z přírody izolovaných kmenů kvasinek, které bylo možno podle citované literatury uvedené v popisu předmětného vynálezu taxonomicky zařadit do rodů *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* a *Trichosporon*, byly naočkovány kličkou ze šikmého hladinového agaru do baněk obsahujících 50 ml tekuté živné půdy o složení: fenoxycetamid 0,2 %, glukóza 0,5 až 1,0 proc.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 %,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,2 %, kvasničný extrakt 0,05 %,  $\text{MgSO}_4$  0,05 %, Na-sůl fenoxyoctové kyseliny 0,05 %; pH živné půdy 6,5. Naočkované kultury v baňkách byly umístěny na třepací stroj a submersní kultivace probíhala při 28 °C.

Z testovaných 30 kmenů vyrostlo za uvedených podmínek za různou dobu 19 kultur. Po odstředění suspenze byl analyzován buněčný sediment s cílem průkazu tvorby 6-APK z V-penicilinu postupy uvedenými v popisu předmětného vynálezu. Ani u jedné z vyrostlých kultur však nebyla prokázána aktivita V-penicilin amidázy.

Dále bylo postupováno tak, že 11 nerostoucích kmenů bylo z dalšího výběru vyřazeno a 19 rostoucích kmenů v živné půdě, kde fenoxycetamid sloužil jako jediný zdroj dusíku, bylo naočkováno do baněk obsahujících 50 ml neselektivní tekuté živné půdy o složení: hydrolyzát kaseinu 0,5 %, pepton 0,5 %, kvasničný extrakt 0,1 %,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,3 %,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  0,5 %,  $\text{MgSO}_4$  0,05 %, Na-sůl fenoxyoctové kyseliny 0,05 %; pH živné půdy 6,5. Naočkované kultury v baňkách byly umístěny na třepací stroj a submersní kultivace probíhala při 28 °C 24 až 48 hodin. Sedimenty intaktních buněk po odstředění byly opět analyzovány na průkaz tvorby 6-APK z V-penicilinu.

U 19 kultur vyrostlých za uvedených podmínek byla u 5 kmenů analyticky prokázána tvorba 6-APK z V-penicilinu. Jednalo se o kmeny *Candida utilis*, *Rhodotorula* sp., *Rhodotorula pulcherina*, *Rhodotorula glutinis* a *Cryptococcus* sp.

Uvedených 5 kmenů bylo v dalším užším výběru hodnoceno kvantitativně na množství produkované V-penicilin amidázy. Kultury byly naočkovány do baněk obsahujících 50 ml tekuté neselektivní živné půdy o složení: kukuřičný extrakt — vysrážený, filtrovaný 2 % (vlhká hmota),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 %,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,2 %,  $\text{MgSO}_4$  0,05 %, Na-sůl fenoxyoctové kyseliny 0,05 %; pH živné půdy 6,9. Submersní kultivace probíhala při 28 stupních Celsia po dobu 30 hodin. Po odstředění kultur byly sedimenty kvantitativně analyzovány na obsah V-penicilin amidázy v buňkách.

U všech kmenů byla prokázána specifická aktivita tohoto enzymu, avšak kvantitativní rozdíly mezi kmeny vyrostlými za uvedených podmínek byly až několikařádové. Nejvyšší specifické aktivity bylo dosaženo u

kmene *Cryptococcus* sp. (0,28  $\mu\text{mol}$  6-APK  $\cdot \text{mg}^{-1}$  suché hmoty buněk) a *Rhodotorula glutinis* (0,012  $\mu\text{mol}$  6-APK  $\cdot \text{mg}^{-1}$  suché hmoty buněk). Pro další selekci a nahromadování výše produkčních kmenů byl proto zvolen jako výchozí materiál kmen *Cryptococcus* sp., neboť jeho specifická aktivita byla více jak řádově vyšší ve srovnání s druhým získaným izolátem.

## Příklad 2

Při zkoumání specifity indukce V-penicilin amidázy během submersní kultivace kmene *Cryptococcus* sp. v živných půdách obsahujících sloučeniny chemicky identické nebo chemicky blízké postranním řetězcům přirozených a polosyntetických penicilinů bylo zjištěno, že nejvyšších specifických aktivit enzymu v buňkách je dosahováno v přítomnosti solí 3-fenylpropionové, 4-hydroxyfenoxyoctové, skořicové a fenoxyoctové kyseliny. Tato skutečnost je uvedena v přehledné charakterizaci kmene *Cryptococcus* sp. v popisu předmětného vynálezu. Některé z uvedených sloučenin jsou využívány jako jediné zdroje asimilovatelného uhlíku, jiné nikoliv. Některé tyto látky tedy fungují jako asimilovatelné induktory, jiné jako „zdarma“ induktory. Těchto poznaných skutečností bylo využito k volbě selektivní chemicky definované živné půdy s cílem selekce a nahromadování rychle rostoucích kmenů na uvedených sloučeninách jako jediných zdrojích asimilovatelného uhlíku, zvláště proto, že většina těchto látek je silně toxická a inhibuje růst.

Kmen *Cryptococcus* sp., který byl získán, jak je uvedeno v příkladu 1, byl očkovan ze šikmého hladinového agaru do baněk obsahujících 150 ml tekuté živné půdy o složení: kukuřičný extrakt — vysrážený, filtrovaný 2 % (vlhká hmota),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 %,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,2 %, kvasničný extrakt 0,05 %, thiamin 0,01 %,  $\text{MgSO}_4$  0,05 %, K-sůl 3-fenylpropionové kyseliny 0,1 %, pH živné půdy 7,2. Submersní kultivace probíhala při 28 °C po dobu 24 hodin.

Vyrostlá kultura byla použita jako inokulum (5 obj. % suspenze) k očkování baněk obsahujících 150 ml tekuté živné půdy o složení: K-sůl 3-fenylpropionové kyseliny 0,5 %,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 %, NaCl 0,05 %, kvasničný extrakt 0,03 %,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,3 %,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  0,2 %,  $\text{CaCl}_2$  0,002 %,  $\text{FeSO}_4$  0,0005 proc.  $\text{MgSO}_4$  0,01 %; pH živné půdy 7,3.

Submersní kultivace probíhala střídavým pasážováním kultur při 28 °C vždy přenosem 5 obj. % vyrostlé kultury ze subkultury první do druhé, z druhé do třetí apod. První subkultura vyrostla za 120 hodin při dosažení suché hmoty buněk při přibližně 1  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ , druhá subkultura za 70 hodin při dosažení téže sušiny, třetí subkultura za 50 hodin, čtvrtá za 70 hodin a pátá subkultura za 45 hodin při dosažení 1,2  $\text{mg}$  su-

šiny. ml<sup>-1</sup>. V šesté a následujících subkulturách se růstová rychlost a výtěžek sušiny buněk nezvyšoval.

Nahromaděná populace rychleji rostoucích buněk v živné půdě obsahující K-sůl 3-fenylpropionové kyseliny jako jediný zdroj asimilovatelného uhlíku byla z poslední subkultury vyseta na Petriho misky se sladinným agarem, vyočkovány individuální kolonie a tak získán rychleji rostoucí kmen utlizující 3-fenylpropionovou kyselinu jako jediný zdroj uhlíku. Specifická aktivita V-penicilin amidázy u tohoto kmene se pohybuje okolo 4 až 6  $\mu\text{mol}$  6-APK. mg<sup>-1</sup> suché hmoty buněk při jeho submersní kultivaci v baňkách v tekuté živné půdě obsahující: kukuřičný extrakt — vysrážený, filtrovaný 0,5 % (vlhká hmota), K-sůl, 3-fenylpropionové kyseliny 0,5 %, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 %, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 %, kvasničný extrakt 0,05 %, thiamin 0,01 %, MgSO<sub>4</sub> 0,01 %; pH živné půdy 7,2. Výtěžek suché hmoty buněk se pohybuje okolo 1,5 až 1,8 mg. ml<sup>-1</sup> za 46 hodin kultivace při 28 °C.

### Příklad 3

Při sledování substrátové specifity V-penicilin amidázy u intaktních buněk *Cryptococcus* sp., k sloučeninám obsahujícím v molekule amidickou CO—NH vazbu, zvláště amidům kyselin chemicky blízkých postranním řetězcům přírodních a polosyntetických penicilinů bylo zjištěno, že některé z nich jsou rovněž substráty, i když reakční rychlost enzymové hydrolýzy je řádově až několikařádově posunuta ve prospěch hydrolýzy V-penicilinu jako substrátu. Tedy jde vesměs o velmi špatné substráty ve srovnání s V-penicilinem. Tato skutečnost je uvedena v přehledné charakterizaci kmene *Cryptococcus* sp. v popisu předmětného vynálezu. Nicméně těchto poznaných skutečností bylo využito k volbě selektivní chemie-

ky definované živné půdy s cílem nahromadění výše produkčních kmenů použitím amidů zmíněných látek jako jediných zdrojů asimilovatelného dusíku.

Kmen *Cryptococcus* sp. získaný jak je uvedeno v příkladu 2, byl očkovan ze šikmého sladinného agaru do baňek obsahujících 150 ml tekuté živné půdy o složení, které je uvedeno rovněž v příkladu 2 v posledním odstavci. Po 46hodinové submersní kultivaci při 28 °C bylo této kultury použito jako inokula (5 obj. %) pro očkování selektivní tekuté živné půdy v baňkách plněných 150 ml půdy o složení: 4-hydroxyfenoxycetamid 0,2 %, K-sůl 3-fenylpropionové kyseliny 0,5 %, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 %, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 proc. kvasničný extrakt 0,03 %, thiamin 0,01 proc. MgSO<sub>4</sub> 0,01 %, pH živné půdy 7,2.

Submersní kultivace probíhá střídavým pasážováním kultur při 28 °C vždy přenosem 5 obj. % vyrostlé kultury ze subkultury první do druhé a následujících tak dlouho, až se růstová rychlost nemění.

Heterogenní populace buněk získaná selektivní selekcí v živné půdě, kde jako jediný zdroj asimilovatelného dusíku sloužil 4-hydroxyfenoxycetamid a jako jediný zdroj asimilovatelného uhlíku K-sůl 3-fenylpropionové kyseliny byla vyseta na Petriho misky se sladinným agarem, vyočkovány individuální kolonie a tak získán kmen se zvýšeným obsahem V-penicilin amidázy v buňkách.

Specifická aktivita enzymu u tohoto kmene se pohybuje mezi 6 až 12  $\mu\text{mol}$  6-APK. mg<sup>-1</sup> suché hmoty buněk při jeho submersní kultivaci v baňkách v tekuté živné půdě obsahující: K-sůl kyseliny 3-fenylpropionové 0,5 %, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 %, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 %, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,3 %, kvasničný extrakt 0,05 %, thiamin 0,01 %, MgSO<sub>4</sub> 0,01 %, CaCl<sub>2</sub> 0,002 proc., FeSO<sub>4</sub> 0,0005 %; pH živné půdy 7,2. Výtěžek suché hmoty buněk se pohybuje okolo 1,3 mg. ml<sup>-1</sup> za 48 hodin při 28 °C.

### PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob selekce a nahromadování mikroorganismů hydrolyzujících fenoxymethylpenicilin na 6-aminopenicilánovou kyselinu, vyznačený tím, že se kultury mikroorganismů naočkují do selektivních chemicky definovaných živných půd, kde jako jediný zdroj asimilovatelného dusíku, a/nebo jak dusíku, tak uhlíku slouží fenoxycetamid, 4-hydroxyfenoxycetamid, 3-fenylpropionamid, fenylakrylamid, a/nebo kde jako jediný zdroj asimilovatelného uhlíku slouží soli kyseliny 3-fenylpropionové, fenylakrylové, fenoxyoctové, 4-hydroxyfenoxyoctové, popřípadě s amidy těchto kyselin sloužících

jako jediný zdroj asimilovatelného dusíku, nebo s anorganickým zdrojem dusíku, výhodně s amonnými ionty, přičemž vyrostlé kultury mikroorganismů se v těchto půdách pasážují tak dlouho, až se nezvyšuje růstová rychlost, načež se vyrostlá kultura vyočkuje a konzervuje.

2. Kmen mikroorganismu *Cryptococcus* sp. CCY 17-22-1, produkující vnitrobuněčnou V-penicilin amidázu, která přednostně hydrolyzuje fenoxymethylpenicilin na 6-aminopenicilánovou kyselinu, získaný způsobem podle bodu 1.