



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

218514
(11) (B1)

(22) Přihlášeno 01 09 81
(21) (PV 6460-81)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 37/00
C 12 R 1/82

(40) Zveřejněno 25 08 82

(45) Vydáno 15 03 85

(75)
Autor vynálezu

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

(54) Kmen mikroorganismu *Penicillium chrysogenum*
CCM F-720

1

2

Vynález se týká nového kmene *Penicillium chrysogenum* CCM F-720, který za běžných kultivačních podmínek produkuje penicilin G a V v podstatně vyšších výtěžcích.

Vynález se týká kmene mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* CCM F-720 produkujícího penicilin G a V.

Tento kmen byl získán z kmene *Penicillium chrysogenum* evidenčního čísla 65/41 působením mutagenů a opakovanými pasivními selekcemi.

Použití mutageny: UV-světlo a nitrometylurea (NMU).

Aplikace UV-světla: Zdrojem světla byla germicidní lampa 40 W s předřazeným stabilizátorem síťového napětí v 5 ml destilované vody byly ozařovány v Petriho misce o průměru 45 ml. Během ozařování byla suspenze míchána na elektromagnetickém míchadle. Vzdálenost misky od zdroje záření byla 20 cm, během ozařování byly ve vhodných časových intervalech odebírány vzorky po 0,5 ml, které byly dále zředěny a vysévány na Petriho misky se sporulační půdou složené melasa, glycerin, kvasniční extrakt a soli, jak je popsáno u postupu pro pasivní selekci.

Aplikace NMU: NMU (K. & K. Laboratories, Inc.) byl aplikován v koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$. Mutagen byl za stálého míchání rozpuštěn v citrátosulfátovém pufru pH 6,0, pak byly přidány spory suspendované v témže pufru. Mutační směs byla míchána na elektromagnetickém míchadle při 25 °C. Ve vhodných časových intervalech byly odebírány vzorky po 1 ml a ředěny do vyředění MNU na neúčinnou koncentraci. Odebírané vzorky byly vysévány na Petriho misky, jak je popsáno u postupu pro pasivní selekci.

Pasivní selekce: Spory pro pasivní selekci byly suspendovány v destilované vodě nebo fyziologickém roztoku, ředěny ředicí řadou a faktorem 10 a očkovány na Petriho misky se shodnou sporulační půdou. Z jednotlivých ředění bylo paralelně očkováno několik misek. Po 6 — 9denní inkubaci při teplotě 25 °C byla u izolátů ukončena sporulace 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 dnů.

Vhodným střídáním mutagenů a pasivní selekcí byl získán izolát 43/28—80 D.

Izoláty byly hodnoceny podle následujícího schématu:

izolovaná kolonie na Petriho misce



šikmý agar



vegetativní inokulum



vlastní fermentace

Získané vysokoprodukční izoláty jsou u-

chovávány ve formě lyofilizovaných konzerv.

Stanovení účinnosti penicilinu bylo prováděno hydroxamátovou metodou.

Tímto hodnotícím systémem byl získán kmen, který je předmětem ochrany.

Kmen tvoří při monosporickém rozsevu na sporulační půdě typu glycerin-melasa během 6 dnů kolonie velikosti 7 — 10 mm při teplotě kultivace 25 °C. Kultura intenzívně sporuluje na různých typech sporulačních půd i na přírodních substrátech, jako je proso, ječmen, kukuřice, rýže apod., sporulace je ukončena během 7 dnů kultivace. Barva vysporulované kultury je sytě zelená. Kolonie na pevných půdách jsou zbrázděné paprskovitými rýhami, které jsou patrné i na spodní straně kolonie. Střed kolonie je proláklý, okraj kolonie je bíle lemován v šířce cca 2 mm. Konidiofor je dlouhý cca 300 μm a má hladké stěny. Štětíčky jsou asymetrické, na větvích vyrůstají svazky metul. Konidionosný krček je zúžen. Konidie jsou oválné, velikosti cca 2,5 až 3 μm . Kmen na agarových půdách je stabilní, několik týdnů, na přírodních substrátech několik měsíců.

Další charakteristiky kmene: Mycelium kmene je středně citlivé k intenzivnímu namáhání v průběhu fermentace, železo při koncentraci 50 γ/ml inhibuje biosyntézu ze 30 až 40 %, biosyntéza penicilinu je inhibována vlastním produktem až při koncentracích penicilinu vyšších než 30 000 j./ml, kmen využívá různé zdroje uhlíku, přednostně laktózu, sacharózu, glukózu a různé oleje, vhodným zdrojem dusíku vedle organických zdrojů jsou i anorganické sloučeniny dusíku, přednostně pak síran amonný. V průběhu fermentace vzniká kolem 3 % vedlejších penicilinů.

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 klíčkovou sporou ze šikmého agaru a inkubována na rotačním třepacím stroji kolem 40 hodin.

Takto připraveným vegetativním inokulem byly očkovány fermentační baňky objemu 500 ml, objem fermentační půdy 40 ml. Zdrojem uhlíku byla laktóza, sacharóza a sójový olej, zdrojem dusíku sójová mouka a amonná sůl, půda dále obsahovala prekursor postranního řetězce penicilinu, soli, uhličitán vápenatý a zdroj síry.

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

Fermentace probíhaly 11 dnů, vzorky pro stanovení účinnosti byly odebírány v 8., 9.,

10. a 11. dni fermentace. Maximální produkce bylo zpravidla dosaženo v 10. dni fermentace. Za uvedených podmínek fermentace bylo v laboratorním měřítku dosahováno 16 500 j./ml.

Kmen *Penicillium chrysogenum*, značený 43/28—80 D, byl uložen v čs. sbírce mikroorganismů (Czechoslovak Collection of Microorganisms), Univerzita J. E. Purkyně, Brno, Tř. Obránců míru 10, pod čís. CCM F-720.

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Kmen mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* CCM F-720, produkující penicilin V a G.