



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

253 986

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 04 05 86
(21) PV 3197-86.K

(51) Int. Cl.

C 12 N 1/14

(40) Zveřejněno 16 04 87
(45) Vydáno 01 07 89

(75)
Autor vynálezu

MATELOVÁ VLASTA RNDr. CSc., ROZTOKY U PRAHY, VRBOVÁ 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-786

Účelem řešení je získání kmene produkujícího penicilin ve vyšších koncentracích než je dosahováno předchozími kmeny. Penicilin syntetizuje mutanta kmene *Penicillium chrysogenum* získaná po působení vhodných mutagenů a pasivní selekci v médiu obsahujícím vhodný zdroj uhlíku, dusíku, síry, fosforu, prekurzoru, křídý, protipěnidla a stopových prvků při vysoké konverzi zdroje uhlíku za aerobních podmínek při 25 °C. V průběhu 168 hodin kultivace kmen, na který je uplatňována patentová ochrana, vytváří za laboratorních podmínek 31 000 j./ml penicilinu V nebo 25 800 j./ml penicilinu G.

253 986

Vynález se týká kmene mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* CCM F-786 (interní označení UV LV/20-I/12) produkujícího penicilin V a G.

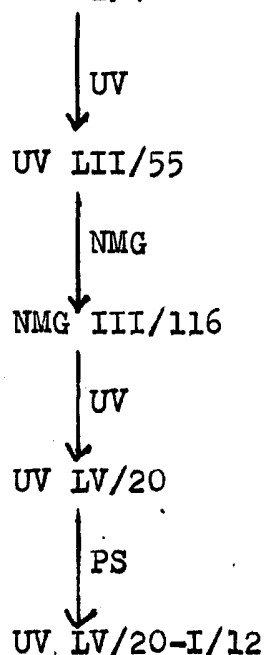
Dnešní průmyslová technologie výroby penicilinu patří mezi nejlépe zvládnuté technologie fermentačního průmyslu. O tom svědčí enormní vzestup produkce z méně než 10 j/ml v roce 1940 na 1 000 j/ml v roce 1950 a na 30 000 a více j/ml v současné době. Na vzestupu výtěžnosti penicilinu se podílejí tři činitelé, je to šlechtění kmenů, poznání jejich fyziologie a inženýring procesu.

Šlechtění kmenů má dnes již 40letou tradici. Od počáteční empirie je genetická práce v současné době převáděna na vědeckou bázi, je nahražována racionální selekční technikou. Hlavním ukazatelem efektu šlechtění je vzestup celkového množství penicilinu na jednotku objemu fermentoru za jednotku času. Kmen je třeba posuzovat i z dalších hledisek, např. podle schopnosti sporulace, morfologie, podle schopnosti růstu při vyšší denzitě, podléhání shearu, filtrovatelnosti pudy po fermentaci, podle schopnosti konverze zdroje uhlíku, podle schopnosti využívat anorganické zdroje dusíku místo organických, podle resistance vůči vlastnímu produktu, tj. penicilinu, podle inkorporace postranního řetězce do molekuly penicilinu, podle odolnosti na toxické působení prekurzorů, podle vhodných technologických vlastností, čímž je myšlena např. tvorba pěny, ulpívání na stěnách tanků atd. Všechny tyto faktory mohou být předmětem řízené selekce.

Kmen *Penicillium chrysogenum* CCM F-786, interního označení UV LV/20-I/12, 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 uvedena

genealogická linie vedoucí ke kmeni, na nějž je uplatňován patentový nárok.

Penicillium chrysogenum NMU 2/40



Vysvětlení zkratk: UV - působení UV-světla

NMG - působení nitrosometylguanidinu

PS - pasivní selekce

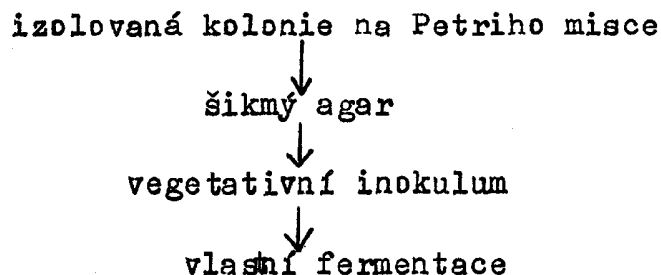
Aplikace mutagenů: zdroj^{UV}em/světla byla germicidní lampa Philips TVV 40 W s předřazeným stabilizátorem síťového napětí ST 250 o výkonu 250 W a citlivosti 1%. Suspense spor ve vodě, 5 ml, byla ozařována v Petriho misce o průměru 45 mm. Během ozařování suspension byla míchána na elektromagnetickém míchadle. Vzdálenost misky od zdroje ozáření byla 20 cm, záření bylo ve vhodných časových intervalech přerušováno odbíráním 0,5 ml vzorku, které byly dále ředěny, a vysévány na Petriho misky se sporulační půdou.

Pro mutagenizaci nitrosometylguanidinem byla používána koncentrace 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 pufrováno citrofosfátovým pufrem o pH 6,0. V časových intervalech byly odbírány vzorky a ředěny až na neúčinnou koncentraci NMG a vysévány na Petriho misky se sporulační půdou.

Spóry pro pasivní selekci byly suspendovány v destilované vodě nebo fyziologickém roztoku, ředěny řadou s faktorem 10. Z jednotlivých ředění bylo paralelně očkováno několik misek se sporulační půdou.

Výše uvedeným způsobem aplikace mutagenů a pasivní selekcí byl získán izolát UV LV/20-I/12.

Izoláty byly hodnoceny dle následujícího schématu:



Izoláty byly hodnoceny ve 2 pokusech před konzervací a ve 3 pokusech po konzervaci. Konzervy slouží k dlouhodobému uchovávání sporového materiálu a umožňují zachování vhodných růstových a produkčních vlastností.

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

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

Kmen tvoří při monosporickém rozsevu na sporulační půdě typu glycerin-melasa kolonie velikosti cca 12 mm během 9 dnů kultivace při 25°C, střed kolonie je propadlý, od valu k okraji je kolonie žvrásněná, barva spor je béžová. Kultura dobře a rychle sporuluje na různých typech sporulačních půd i na přírodních substrátech (proso, kroupy atd.). Počet spor v 1 ml suspence vzniklé smytím Endovy zkumavky 10 ml vody se pohybuje kolem $2 \cdot 10^7$ /ml a počet spor v 1 ml suspence vzniklé smytím spor 30 g krup 50 ml vody je $8 \cdot 10^7$ spor/ml.

Pro přípravu vegetativního inokula lze použít půdy obsahující jako zdroj uhlíku glukózu nebo sacharózu při dosažení shodných růstových i produkčních hodnot. Vhodným zdrojem dusíku pro přípravu inokula je kukuřičný extrakt. Optimální stáří

vegetativního inokula vzhledem k dosažení maximálních produkcí je 48 hodin při inkubační teplotě 25°C, fermentační půda je inokulována 10% vegetativního inokula. Kmen má značné nároky na dostatečné zásobení kyslíkem i při přípravě vegetativního inokula.

Maximálních produkcí je s tímto kmenem dosaženo ve fermentační půdě typu laktóza či sacharóza - Pharmamedia. Pro uvedený kmen je klíčově důležitá forma zdroje síry a anorganického dusíku, nemalý efekt pak má i obohacení půdy ionty hořčíku, který příznivě ovlivňuje permeabilitu buněčné membrány. Místo Pharmamedie lze použít i sojovou či arašidovou mouku bez významného poklesu produktivity. Utilizace zdroje uhlíku, resp. laktózy je nejekonomičtější při koncentraci 4 - 8%, pro dosažení maximálních produkcí je optimum 13%, z 1 mg laktózy vzniká v laboratorním měřítku 250 j./ml penicilinu.

Citlivost kmene na mechanické namáhání je na úrovni dobrých kmenů, kmen má značné nároky na přenos kyslíku a je citlivý na pokles rozpuštěného kyslíku nebo na zastavení míchání. Biosyntéza penicilinu u tohoto kmene není zastavena v přítomnosti 50 000 j./ml modelově přidaného penicilinu, v průběhu standardní fermentace je rozloženo maximálně 25% penicilinu a vzniká kolem 2% p-hydroxybenzylpenicilinu.

Příklad 1

Vegetativní inokulum bylo připravováno submersní kultivací v 500 ml varných baňkách se 40 ml inokulační půdy (zdroj uhlíku sacharóza, dusíku kukuřičný výluh, síran amonný a anorganické sole). Půda pro přípravu vegetativního inokula byla zaočkována kličkou spor ze šikmého agaru nebo 2,5 ml sporové suspence vzniklé smytím krup (30 g) 50 ml vody a byla inkubována na rotačním třepacím stroji 48 hodin.

Takto připraveným vegetativním inokulem byly očkovány 10% fermentační baňky obsahu 500 ml, objem fermentační půdy 40 ml. Zdrojem uhlíku byla sacharóza a laktóza, zdrojem dusíku Pharmamedia nebo sojová či arašidová mouka, amonná sůl, půda dále obsahovala prekurzor postranního řetězce, sole, uhličitan vápenatý k pufování půdy a zdroj síry.

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

Fermentace za uvedených podmínek trvala 8 dnů, vzorky pro stanovení účinnosti byly odebírány v 6., 7. a 8.dni fermentace. Maxima produkce bylo dosahováno v 7.dni fermentace.

Produkční srovnání výchozího kmene s kmenem, na který je uplatňován patentový nárok:

kmen (interní označení)	penicilin V j/ml	penicilin G j/ml
NMU 2/4o	25 000	23 000
UV LV/20-I/12	31 000	25 800

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Kmen mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* CCM-F-786 produkující penicilin V a G.