SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(22) Dátum podania: 30.04.96

(31) Číslo prioritnej prihlášky: PV2412-95

(32) Dátum priority: 18.09.95

(33) Krajina priority: CZ

(40) Dátum zverejnenia: 09.07.97

(86) Číslo PCT:

(21) Číslo dokumentu:

555-96

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[6] :

C 12N 1/14
// C 12P 37/00
(C 12N 1/14,
C 12R 1:82)

(71) Prihlasovateľ: Biotika, a. s., Slovenská Ľupča, SK;

(72) Pôvodca vynálezu: Košč Pavel, Ing., Banská Bystrica, SK;
Borošová Gabriela, Ing., Banská Bystrica, SK;
Bučko Michal, Ing., DrSc., Banská Bystrica, SK;
Lucina Dušan, Ing., Banská Bystrica, SK;
Ďuranová Viera, Ing., Banská Bystrica, SK;
Lichý Miloš, Banská Bystrica, SK;
Kluka Ľubomír, Ing., Banská Bystrica, SK;
Rakyta Ján, Ing., Banská Bystrica, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Vysokoprodukčný kmeň mikroorganizmu Penicillium chrysogenum**

(57) Anotácia:
Vysokoprodukčný kmeň mikroorganizmu Penicillium chrysogenum CCM 8197 (NMG-FOOK 31). Kmeň bol získaný selekciou mutantov vznikajúcich pôsobením chemických mutagénov a pôsobením kyseliny fenoxyoctovej na spóry pri submerznej kultivácii. Nasledujúcou pasívnou selekciou bol získaný Penicillium chrysogenum CCM 8197 (NMG FOOK 31) produkujúci viac než 35 000 IU PEN V/ml za 168 hod. kultivácie v bankách pri vzdušnení, pri teplote 25°C.

Vysokoprodukčný kmeň mikroorganizmu Penicillium chrysogenum CCM

Oblasť techniky

Vynález sa týka vysokoprodukčného kmeňa mikroorganizmu Penicillium chrysogenum CCM 8197 (NMG-FOOK 31) produkujúceho penicilín V (PEN V) vo vyšších koncentráciách ako doposiaľ používané kmene.

Doterajší stav techniky

Celosvetový objem výroby penicilínu sa neustále zvyšuje, okrem jeho priameho využívania pri liečbe sa veľká časť produkcie používa ako surovina pre výrobu 6-aminopenicilánovej kyseliny a polosyntetických β-laktámových antibiotík. Zvýšenie produktivity používaných produkčných kmeňov je ekonomicky najvýhodnejší spôsob zvyšovania objemu výroby. Značnú zásluhu na zvýšení produkčnej schopnosti kmeňov má rozvoj metód šľachtenia, ktoré sa opierajú o selekciu náhodných mutantov, indukovaných pomocou vhodných mutagénov. Okruh používaných mutagénov sa vyberá podľa ich účinku tak, aby dochádzalo k zvyšovaniu produkcie a nedošlo pritom ku zhoršovaniu životaschopnosti mikroorganizmov.

Pred uvedením súčasného vynálezu boli známe iné kmene, produkujúce PEN V a PEN G väčšinou na báze Penicillium chrysogenum. Dôležitou vlastnosťou produkčného kmeňa je jeho produktivita a udržanie produkčnej aktivity, pokiaľ možno v čo najdlhšom kultivačnom čase. Produkčné kmene používané v súčasnosti produkujú do fermentačného média približne do 60 000 IU/ml penicilínu pri kultivačnej dobe okolo 120 až 200 hodín.

Je známy Penicillium chrysogenum CCM F-558 popísaný v Čs.AO 187216 produkujúci PEN G a PEN V za 120 hodín s výťažnosťou 19 000 IU/ml peniclínu na pôde so sacharózou a sójovou múkou.

Ďalej je známy kmeň Penicillium chrysogenum CCM F.-569 popísaný v Čs.AO 199980 produkujúci 24 000 IU/ml PEN G a PEN V za 175 hodín kultivácie na pôde s pharmamédiou a sacharózou. Charakteristickou vlastnosťou tohto kmeňa je jeho schopnosť rastu a produkcie aj pri vysokej koncentrácii amoniakálnych iónov, reprezentovaných v živných pôdach dusíkatými látkami, napríklad síranom amónnym, močovinou a podobne. Je známa jeho schopnosť dosahovať vysoké produkcie penicilínu i na depótnom uhlíkatom zdroji v živnej pôde, napríklad na laktóze. Týmto bolo dosiahnuté zjednodušené riadenie fermentačného procesu oproti technológii založenej na nepretržitom dávkovaní sacharózy ako uhlíkatého zdroja.

Ďalším známym kmeňom je kmeň Penicillium chrysogenum CCM F 647 popísaný v Čs.AO 200944, ktorý produkuje 24 000 IU/ml penicilínu za 164 hod. kultivácie. Vlastnosťou tohto kmeňa je jeho vysoká stabilita, nestráca produkčnú schopnosť pasážovaním na pevných pôdach do IV. generácie. Jeho prednosťou je, že nemá špecifické požiadavky na zdroj uhlíka.

Kmeň Penicillium chrysogenum Thom bol získaný dlhodobým pôsobením p-fluorfenylalanínu a ožiarením. Produkuje okolo 22 000 IU/ml penicilínu za 164 hodín.

Podstata vynálezu

Nový vysokoprodukčný kmeň mikroorganizmu Penicillium chrysogenum CCM 8197 (interné označenie NMG-FOOK 31) produkuje zvýšenú koncentráciu PEN V, ale i PEN G u vybraných klonov tohto kmeňa. Je uložený v Čs. zbierke mikroorganizmov v Masarykovej univerzite v Brne, Tvrdého 14, pod číslom CCM 8197.

Kmeň Penicillium chrysogenum CCM 8197 (interné označenie NMG-FOOK 31) bol získaný pôsobením chemických mutagénov a pôsobením kyseliny fenoxyoctovej na spóry pri submerznej kultivácii východiskového kmeňa CCM F-760. Nasledujúcou pasívnou selekciou bol získaný kmeň Penicillium chrysogenum CCM 8197 (NMG-FOOK 31) produkujúci 35 000 IU PEN V/ml za 168 hodín. Kultivácia prebieha v bankách pri prevzdušňovaní, pri teplote 25°C.

Postup šľachtenia je popísaný na nasledujúcej schéme, na ktorej je znázornená genealogická línia vedúca k novému produkčnému kmeňu:

Penicillium chrysogenum

CCM F - 760

↓ PS

CCM F - 760 - 19

↓ NMU

NMU XXII/39

↓ NMG

NMG XXXI/42

↓ FOOK

NMG FOOK-31

Vysvetlenie skratiek:

PS - pasívna selekcia

NMU - pôsobenie nitrózometylmočoviny
NMG - pôsobenie nitrózometylguanidínu
FOOK pôsobenie kyseliny fenoxyoctovej

Nitrózometylmočovina bola aplikovaná v konečnej koncentrácii 6 mg/ml. Spórová suspenzia v citrofosfátovom pufri pH 6,0 bola miešaná v uzavretých Erlenmayerových bankách. Po pridaní mutagénov boli odoberané vzorky vo vhodných časových intervaloch a to po 30-60 min. a po príslušnom riedení boli vyočkované na Petriho misky so sporulačnou pôdou.

Pri aplikácii nitrózometylguanidínu bola použitá koncentrácia mutagénov 1 mg/ml v konečnej mutačnej zmesi. Doba aplikácie bola od 15-60 min. za miešania v uzavretých Erlenmayerových bankách, pH mutačnej zmesi bolo pufrované citrofosfátovým pufrom o pH 6,0. V určitých časových intervaloch boli odoberané vzorky, riedené až na neúčinnú koncentráciu NMG a vyočkované na Petriho misky so sporulačnou pôdou.

Do 500 ml varnej banky sa vleje 40 ml živnej pôdy obsahujúcej sacharózu, corn-steep, síran amónny, dusičnan sodný, uhličitan vápenatý, soli anorganického dusíka a 0,25 % kyseliny fenoxyoctovej. Po vysterilizovaní sa pôda naočkuje 2 ml suspenzie spór kmeňa Penicillium chrysogenum. Nechá sa kultivovať na trepacom stroji pri 230ot./min., pri teplote 25°C. Po 48 hod.kultivácie sa kultúra vyočkuje na sporulačnú agarovú pôdu v Petriho miskách a nechá sa kultivovať 8-10 dní pri teplote 25°C.

Na pasívnu selekciu boli pripravené suspenzie spór v sterilnej destilovanej vode.

Popísanou aplikáciou mutagénov, pôsobením kyseliny fenoxyoctovej a pasívnou selekciou bol získaný izolát NMG FOOK 31.

Izoláty boli hodnotené podľa nasledujúcej schémy:

izolovaná kolónia na Petriho miske

↓

šikmý agar

↓

vegetatívne inokulum

↓

submerzná kultivácia

Produkčná aktivita izolátov bola stanovená vo dvoch pokusoch pred zakonzervovaním a v troch pokusoch po konzervácii. Konzervy slúžia k dlhodobému uchovávaniu spórového materiálu a umožňujú zachovávanie rastových a produkčných schopností.

Stanovenie účinnosti penicilínu bolo robené spektrofotometrickou imidazolovou metódou.

Morfologická charakteristika

Kmeň vytvára pri monospórickom rozseve na sporulačnej pôde typu glycerín - melasa kolónie o veľkosti cca 12 mm za dobu 9 dní kultivácie pri 25°C. V strede kolonie sa vytvára kruhovitý kráter, od tohto stredového kruhovitového kráteru po okraj je kolónia zvrásnená. Farba spór je béžová . Kultúra dobre a rýchlo sporuluje na rôznych typoch sporulačných pôd i na prírodných substrátoch napr. jačmeň, ryža a pod. Počet spór v 1 ml suspenzie, ktorá sa získa zmytím povlaku spór na šikmom agare v Endovej skúmavke 10 ml vody sa pohybuje okolo 1 . 10^7. Kmeň uchovávaný pri teplote 5°C na agarových pôdach je stabilný 5 až 6 týždňov, na prírodných substrátoch niekoľko mesiacov, minim. však 3 mesiace, v lyofilizovanom stave cca 5 rokov a v tekutom dusíku viac ako 5 rokov. Pre prípravu inokula sa môže použiť pôda obsahujúca sacharózu, glukózu ako zdroj uhlíka a kukuričný extrakt ako zdroj organického dusíka. Rast inokula je cca 48 hod. pri teplote 25°C. Maximálna produkcia u tohto kmeňa sa dosiahne na fermentačnej pôde obsahujúcej laktózu alebo sacharózu, sójovú múku, kukuričný extrakt alebo pharmamédiu, zdroj síry, anorganického dusíka a prekurzor. Kmeň vykazuje dobrú odolnosť oproti mechanickému namáhaniu, má pomerne vysoké nároky na prenos kyslíka a je citlivý na pokles rozpustného kyslíka v médiu pod 10 % nasýtenia.

Fyziologická charakteristika

Optimálna teplota 25°C, optimálne pH 6,3 až 7,0. Jedná sa o aeróbny mikroorganizmus, ktorý skvasuje glukózu, fruktózu, sacharózu, laktózu. Dobre hydrolyzuje škrob a bielkoviny, dusičnany redukuje. K rastu vyžaduje biotín, z aminokyselín fenylalanín.

Výhody vysokoprodukčného kmeňa Penicillium chrysogenum CCM 8197 spočívajú v tom, že dosahuje vyššiu produkciu oproti východziemu kmeňu. Je menej citlivý na zmeny koncentrácie kyseliny fenoxyoctovej v živnej pôde a preto je výhodný pre biosyntézu PEN V v podmienkach priemyselnej produkcie, pričom jeho hlavnou výhodou je vyššia produkčná schopnosť, keď za 168 hod.kultivácie je možné dosiahnuť výťažnosť 35 000 IU/ml penicilínu. Kmeň nie je enormne citlivý na mechanické namáhanie, čo je výhodné pri priemyselnom využití, lebo nedochádza k poškodzovaniu mycélia. Z týchto dôvodov je vhodný pre použitie v priemyselných fermentoroch.

Príklady prevedenia vynálezu

Príklad č.1.

Sacharózová inokulačná pôda v 500 ml varných bankách s náplňou 60 ml sa naočkuje spórovou suspenziou a kultivuje sa pri 25°C na rotačnom trepacom stroji 40 hod. Narasteným vegetatívnym inokulom sa naočkovali a kultivovali na rotačnom trepacom stroji produkčné banky so živnou pôdou obsahujúcou laktózu, pharmamediu, síran amónny, uhličitan vápenatý a prekurzor.

Fermentácia uvedeným spôsobom trvala 8 dní. Maximálna produkcia bola dosiahnutá v 7. dni fermentácie Produkčná schopnosť kmeňa, na ktorý je uplatňovaný patentový nárok je nasledujúca:

Kmeň	Interné označenie kmeňa	PEN V IU/ml	PEN G IU/ml
CCM 8197	NMG-FOOK 31	35 100	33 100

Priemyselná využiteľnosť

Nový vysokoprodukčný kmeň mikroorganizmu Penicillium chrysogenum CCM 8197 (NMG FOOK 31) je možné využiť pri priemyselnej výrobe penicilínu V a penicilínu G.

PATENTOVÉ NÁROKY

Vysokoprodukčný kmeň mikroorganizmu Penicillium chrysogenum CCM 8197 (NMG FOOK 31) produkujúci penicilín V a penicilín G.