



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

200 944

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 27 12 78
(21) PV 8891-78

(51) Int. Cl.⁷C 12 N 1/14

(40) Zveřejněno 31 01 80
(45) Vydáno 01 02 83

(75) ZELENÝ KAREL RNDr., PRAHA
Autor vynálezu MATEJOVÁ VLASTA RNDr., ROZTOKY U PRAHY
ČULÍK KAREL RNDr., PRAHA

(54) Kmen mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* CCM F-647

1

Vynález se týká kmene mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* UV XXVII/74 produkujícího ve zvýšené míře penicilin V,G a 6-aminopenicilinovou kyselinu (6-APK). Předností kmene je, že nemá specifické požadavky na zdroj uhlíku.

Tento kmen byl získán z kmene *Penicillium chrysogenum* evidenčního čísla 2/170 řadou opakovaných mutagenních zásahů - nitrosomethylurea, N-methyl-N-nitrosoquanidin, UV-světlo, parafluorophenylalanin - a následných pravidelně zařazovaných pasivních selekcí.

Izoláty po mutagenních zásazích a z pasivních selekcí byly hodnoceny podle následujícího schématu:

izolovaná kolonie na Petriho misce
↓
šikmý agar
↓
vegetativní inokulum
↓
vlastní fermentace

Vegetativní inokulum bylo připravováno submersně v 500 ml varných baňkách se 60 ml inokulační půdy, která obsahovala základní živiny, tj. zdroj uhlíku (sacharóza), dusíku (kukuřičný extrakt v kombinaci s anorganickým zdrojem dusíku) a sole. Vegetativní

baňky byly zaočkovány kličkou spor za šikmého agaru a inkubovány na rotačním třepacím stroji 48 hodin.

Takto připraveným vegetativním inokulem byly očkované fermentační baňky o obsahu 500 ml, objem půdy 40 ml. Zdrojem uhlíku byla sacharóza přidávaná ve formě draže, zdrojem dusíku byla sojová mouka, půda dále obsahuje prekursor, křídou a zdroj síry.

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

Izoláty jsou několikrát hodnoceny před a po lyofilizaci, která slouží dlouhodobému uchovávání kultur.

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

Produkční srovnání kmene UV XXVII/74 s kontrolním kmenem CCM F-558 (UV XII/46).

Fermentační postup pro biosyntézu penicilinu V.

Kontrolní kmen UV XII/46 a kmen UV XXVII/74 byly fermentovány v 500 ml varných baňkách se 40 ml fermentační půdy značené CNS na rotačním třepacím stroji s 230 obr./min., výstředností 25 mm, což odpovídá přenosu 0,81 ml kyslíku/ml/hod. Zaočkování je provedeno 10% obj. vegetativního inokula. Složení ferment. půdy CNS (v % hmot.):

sojová mouka	6,0
sacharóza	0,75
sacharóza v dávkách	13,75
fenoxycetová kys.	0,67
uhličitan vápenatý	0,9
thiosíran sodný	0,8
20% roztok hydroxydu sodného	0,2 % obj.

Všechny ingredience se rozpustí ve vařící vodě a po dvou hodinách stání je zkontrolováno pH, eventuálně je upraveno na 8,0. Po sterilizaci bývá 7,5 až 7,7. Doba sterilizace je 20 minut při 120 °C.

Sacharóza se dává ve formě dražé sterilizovaného gama zářením podle schématu:

přidávaná látka v % hmot.	H o d i n y					Celkové množství
	24	48	72	96	192	
sacharóza	1,25	2,5	3,75	3,75	2,5	13,75

Složení fermentační půdy LS₁MOD (v % hmot.):

sojová mouka	6,0
laktóza	10,0
sacharóza v dávkách	3,74
fenoxycetová kyselina	0,67

thiosíran sodný	0,8
sojový olej	0,1 % obj.(baňku
20% roztok hydroxydu sodného	0,2 % obj.
0,6 % čpavková voda	0,1 % obj. přidáno ve 168. hodině

Půda je připravována shodně s půdou CNS. Sacharóza je dávkována ve formě dražé (192 hod.) a z 50% roztoku (24. a 48. hod.) následovně:

přidávaná látka v % hmot.	H o d i n y			Celkové množství
	24	48	192	
sacharóza	0,62	0,62	2,5	3,74

Složení fermentační půdy 16 (v % hmot):

pharmamedia	7,9
laktóza	14,0
sacharóza v dávkách	3,74
fenoxycetová kyselina	0,75 + 0,2 přidáno z 10% sodné soli v 96. hodině
uhličitan vápenatý	0,9
thiosíran sodný	0,8
sojový olej	0,1 % obj./baňku
20 % roztok hydroxydu sodného	0,2 % obj.
0,6 % čpavková voda	0,1 % obj. přidáno ve 168. hodině
kyselý fosforečnan	
draselný	0,067 %

Půda je připravována shodně s půdou CNS. Sacharóza je přidávána shodně s půdou LS₁MOD.

Fermentační postup pro biosyntézu penicilinu G.

Fermentační postupy pro biosyntézu penicilinu G jsou shodné s postupy pro penicilin V, liší se pouze v tom, že fermentační půdy neobsahují fenoxycetovou kyselinu jako prekursor, ale sodnou sůl fenylacetové kyseliny, která je dávkována v průběhu fermentace ve formě dražé nebo z 5% roztoku následovně (uvedeno v % hmot).

Fermentační půda	H o d i n y					Celkové množství %
	24	48	72	96	120	
CNS	0,19	0,19	0,19	0,095	---	0,665
LS ₁ MOD	0,19	0,19	0,19	0,095	0,085	0,75
16	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,95

Fermentační postupy pro biosyntézu 6-APK.

Fermentační postupy pro biosyntézu 6-APK jsou shodné s postupy pro biosyntézu penicilinů, liší se v tom, že fermentační půdy neobsahují žádný prekursor.

Fermentace probíhá při teplotě 25 °C 11 dnů, vzorky pro stanovení účinnosti jsou odebírány v 9., 10 a 11. dni fermentace. Stanovení se provádí hydroxamátovou metodou s příslušnými standarty. Obsah vzniklých produktů byl sledován chromatograficky, zejména vznikající vedlejší peniciliny při 6-APK, detekce byla provedena biologicky.

Produkční srovnání.

kmen	fermentační půda:	produkt:	produkce j/ml	obsah přísl. produktu %
UV XII/46	CNS	G	18000	99
		V	19500	98
		6-APK	8000	85
	LS ₁ MOD	V	16500	98
		6-APK	9500	90
	16	G	17000	99
V		18000	98	
UV XXVII/74	CNS	G	20000	99
		V	22000	98
		6-APK	10000	85
	LS ₁ MOD	V	19500	98
		6-APK	12500	90
	16	G	23000	99
V		24500	98	

Zvýšení produkce kmene UV XXVII/74 je na sacharóзовé půdě pro G i V penicilin oca 10 %, pro 6-APK 30 %, na laktóзовých půdách je zvýšení produkce podstatně výraznější, oca o 30 % a to z toho důvodu, že u kontrolního kmene UV XII/46 dochází na laktóзовých půdách ke snížení produkce.

Morfologie kmene: Kmen UV XXVII/74, tj. *Penicillium chrysogenum* CCM F 647 tvoří při monosporickém rozsevu na sporulační půdě typu glycerin melasa kolonie velikosti 11 mm během 10 až 14 dnů.

Na okraji kolonií tvoří radiální vrásky ne vyšší než 1 mm s kruhovitým valem uprostřed v průměru 7 mm a vysokým 2 mm. Na okraji je nízká bílá zóna. Kolonie mají elipsoidní až kulovitý tvar o rozměru 4 až 5 μ m x 3 až 4 μ m, při mikroskopických sledováních jsou bezbarvé. Kultura dobře sporuluje na různých typech sporulačních půd, barva vysporulované kultury je sytě zelená, po delší době kultivace šednoucí.

Kmen UV XXVII/74 je vysoce stabilní, neztrácí produkční schopnost pasážováním na

pevných půdách do IV. generace.

Kmen *Penicillium chrysogenum*, označený jako UV XXVII/74 byl uložen v Čs. sbírce mikroorganismů (Czechoslovak Collection of Microorganismus), Universita J.E.Purkyně, Brno, tř. Obránců míru 10, pod číslem

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Kmen mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* CCM F-647, produkující penicilin V, G a 6-aminopenicilánovou kyselinu.