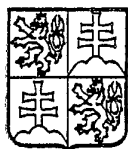


ČESKÁ  
A SLOVENSKÁ  
FEDERATIVNÍ  
REPUBLIKA  
(19)



FEDERÁLNÍ  
ÚŘAD PRO  
VYNÁLEZY

(21) Číslo přihlášky: **6340-88**  
(22) Přihlášeno: 26. 09. 88  
(40) Zveřejněno: 18. 11. 92  
(47) Uděleno: 31. 12. 92  
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17. 03. 93

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>:  
**C 12 P 35/06**

- (73) Majitel patentu:  
Výskumný ústav liečiv, Modra, CS;
- (72) Původce vynálezu:  
Welward Ladislav ing. CSc., Banská  
Bystrica, CS;  
Potančoková Marta, Banská Bystrica, CS;  
Rakyta Ján ing., Banská Bystrica, CS;  
Martvoň Augustín doc. ing. CSc., Bratislava,  
CS;

- (54) Název vynálezu:  
**Kmeň mikroorganizmu Acremonium  
chrysogenum CCF-2035**

- (57) Anotace:  
Vynález sa týka kmeňa mikroorganizmu Acremonium chrysogenum CCF-2035 produkujúceho cefalosporín C. Tento kmeň bol získaný z kmeňa Acremonium chrysogenum CCM F-750 šľachtením zameraným na zvýšenie produkcie cefalosporínu C.

Vynález sa týka kmeňa mikroorganizmu *Acremonium chrysogenum* CCF-2035 produkujúceho cefalosporín C /ďalej CFS-C/. Tento kmeň bol získaný z kmeňa *Acremonium chrysogenum* CCM F-750, šľachtením zameraným na zvýšenie produkcie CFS-C.

Východzí kmeň dosahoval produkčnú aktivitu v baničkách 10 200 ug/ml a v tančíku 22 400 ug/ml.

Popisovaný kmeň mikroorganizmu *Acremonium chrysogenum* CCF-2035 bol získaný tak, že materský kmeň *Acremonium chrysogenum* CCM-740, bol vystavený mutagénnemu šľachteniu UV-svetlom.

Šľachtenie bolo robené tak, že vysporulovaná kultúra rodičovského kmeňa na šikmom agare SP-S o zložení: peptón 1 %, maltóza 3,8 %, tekutá rafináda /ťažká šťava/ o obsahu 60 %, sacharózy 4 %, agar 2,4 % sa zmyla 10 ml sterilnej vody, prefiltrovala cez vatovú zátku umiestnenú na pipete, za účelom oddelenia hýf a artrospór od konídií. Z takejto suspenzie konídií, vhodne nariedenej sa očkovali Petriho misky s pôdou SP-S.

Mutagenný zásah sa robil pomocou UV svetla germicídnou lampou Philips TUV 30 W s rozdelením spektrálnej energie - vlnová dĺžka 253,7 nm až 93,5 %, ostatné vlnové dĺžky 6,5 %. Vzdialenosť misky od zdroja žiarenia bola 30 cm. Po ožiarení sa misky okamžite preniesli do inkubátora na teplotu 28 °C, kde sporulovali 11 dní. Vysporulované kolónie boli za aseptických podmienok izolované a prenesené na šikmý agar pôdy SP-S. Ako pomnožovacia submerzná pôda sa použila pôda IP-V o zložení: sacharóza 1,5 %,  $C_2H_7O_2N$  0,5 %, DL-metionín 0,1 %,  $KH_2PO_4$  0,027 %, kukuričný výluh /100 %-ný/ 0,8 %, metyloleát 0,08 %. Po 72 hodinovej kultivácii na rotačnom trepacom stroji 4 Hz pri teplote 27 °C, sa získalo vegetatívne inokulum /I. vegetatívny stupeň/.

4 ml tohoto inokula sa očkovali 500 ml varné banky s obsahom 60 ml pôdy IP-V a kultivovali pri teplote 27 °C na rotačnom trepacom stroji 48 hodín /II. vegetatívny stupeň/.

Z narasteneho inokula sa 4 ml očkovali 500 ml varné banky plnené 40 ml produkčnej pôdy PP-II/as o zložení: škrob kukuričný 3,2 %, dextrín 6 %, sacharóza 1,5 %, glukóza 0,5 %,  $CaCO_3$  1,1 %,  $NH_4/2SO_4$  1,5 %,  $KH_2PO_4$  0,5 %,  $MgSO_4$  0,3 %, kukuričný výluh 100 %-ný 8,7 %, sojový olej 1,9 %. DL-metionín do pôdy nepridávame, pretože nároky produkčného mikroorganizmu na túto aminokyselinu sú dostatočne zabezpečené inými zložkami pôdy napr. kukuričným výluhom.

#### Príklad 1

Konídie materského kmeňa *Acremonium chrysogenum* CCM F-750 asepticky zmyté z Endovej skúmavky 10 ml sterilnej vody a nariedené 1000krát sa s 0,5 ml naočkovali na Petriho misky s pôdou SP-S. Misky se vystavili 1 minútovému pôsobeniu UV svetla v aseptickom boxe. Po ožiarení sa misky okamžite preniesli do inkubátora a po 11 dňoch sa 55 samostatných kolónii preočkovalo na šikmé agary s pôdou SP-S. Po narastení za 11 dní sa takto získaní izo-

láty testovali najprv jednobaničkovým testom na produkciu. 5 najlepších izolátov z tohto súboru sa podrobilo druhému stupňu výberu a to v 3 baničkovom teste. Z nich sa získal izolát, ktorý mal o cca 29 % vyššiu produkčnú aktivitu, ako východzí rodičovský kmeň.

Tento kmeň bol zaslaný do zbierky mikroorganizmov na Katedru botaniky nižších rastlín, Prírodovedeckej fakulty UK, Praha 2, Benátska 2, kde mu bolo pridelené číslo CCF-2035.

#### Príklad 2

Produkčný kmeň *Acremonium chrysogenum* CCF-2035 bol z lyofilizovanej konzervy postupne pomnožený na šikmý agar SP-S v Roux-flaši. Kmeň tvorí kolónie krémovej farby s vrásčitým povrchom, v strede s kráterom rôznej veľkosti.

Konídie z Roux-flaši boli v dvojstupňovom inokulačnom postupe pomnožené do vegetatívnej formy. S 1500 ml narasteneho inokula bol naočkovaný laboratórny tančík Chemap 0030. Po 136 hodinách kultivácie sa dosiahla produkčná aktivita 35 800 ug/ml cefalosporínu C, vypustený objem činil 26 000 ml.

Aktivita sa stanovila metódou HPLC.

#### P A T E N T O V É   N Á R O K Y

Kmeň *Acremonium chrysogenum* CCF-2035 produkujúci cefalosporín C.

---

Konec dokumentu

---