



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

245153

(11)

(B1)

/22/ Prihlášené 23 12 81
/21/ PV 9682-81

(51) Int. Cl.⁴
C 12 P 35/06

(40) Zverejnené 29 10 82

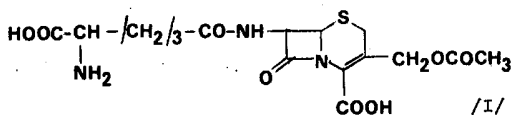
(45) Vydané 15 10 87

(75)
Autor vynálezu

SOMOROVÁ MARTA ing.; LACKO ĽUBOMÍR ing., BANSKÁ BYSTRICA;
MARTVOŇ AUGUSTÍN doc. ing. CSc., BRATISLAVA;
WELWARD LADISLAV ing. CSc., BANSKÁ BYSTRICA; KOŠÁLKO RUDOLF ing. CSc.,
BRATISLAVA; POTANČOKOVÁ MARTA, BANSKÁ BYSTRICA

(54) Kmeň mikroorganizmu *Acremonium chrysogenum*

Produkčný kmeň mikroorganizmu *Acremonium chrysogenum*/Thirum et Sukap/ W. Gams CCM F-729 produkuje za aerobných podmienok kyselínu 7-/D-5-amino-5-karboxy-n-valeramid/-3-acetoxymetyl-3-cefem-4-karboxylovú tzv. cefalosporín C vzorca I

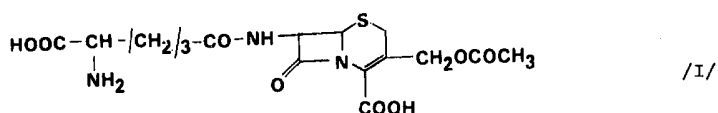


Cefalosporín C sa používa na prípravu polosyntetických cefalosporínových antibiotík.

Cefalosporín C sa pripravuje submerznou fermentáciou v prítomnosti zdrojov síry. Väčšina priemyselných produkčných kmeňov sú auxotrofné mutanty dependentné na DL-metionín.

Kmeň *Acremonium chrysogenum* CCM F-729 nie je závislý na DL-metioníne, produkuje cefalosporín C na ekonomicky výhodných zdrojoch síry, akým je Na₂S₂O₃·5H₂O.

Vynález sa týka nového priemyselného mikroorganizmu produkujúceho kyselinu 7-/D-5-amino-5-karboxy-n-valeramido/-3-acetoxymetyl-3-cefem-4-karboxylovú, obecného vzorca I, tzv. cefalosporín C /CFS-C/



Cefalosporín C sa používa ako východzia surovina pri príprave polosyntetických cefalosporínových antibiotík. Produkčný kmeň bol získaný v screeningovom programe, zameranom na izoláciu kmeňov nezávislých na DL-metioníne.

Východzím kmeňom bola kultúra *Cephalosporium acremonium* WIS OP 163, maximálna produkcia cefalosporínu C dosahovaná na pôdach s tiosíranom sodným ako zdrojom síry bola 200-400 µg/ml. Cefalosporínové antibiotiká odvodené od kyseliny 7-aminocefalosporánovej sú vyrábané prevážne pomocou kmeňa *Cephalosporium acremonium* /po reklasifikácii Gamsom W. v roku 1971 *Acremonium chrysogenum*/.

Rod *Cephalosporium* je v systematike zaradený do čeľade Moniliceae do triedy Fungi imperfecti /Deuteromycetes/. U rodu *Cephalosporium* sú spóry vytvárané len terminálne na nevetvených konídiofóroch, skoro pravidelne posadených na hlavnom mycéliu. *Cephalosporium* tvorí septované hýfy, septy delia protoplazmu na menšie úseky.

Konídionosiče sú jednotlivé, silne bazofilné. Známa je reprodukcia nepohlavnou mitózou a bunečnou elongáciou. Nepohlavné spóry sú jednobunečné konédie s jedným jadrom, vytvárané na hýfách. Bunky mycélia aj konédie obsahujú po jednom haploidnom jadre. Tieto vlastnosti si ponechávajú aj pri submerzných kultiváciách.

Cephalosporium ako eukariotický organizmus má membránou ohraničené jadro s chromozomálnou štruktúrou a cytoplazmou s pomerne komplexnou membránovou štruktúrou /mitochondrie, endoplazmatické retikulum/. Významná je najmä mimobunečná akumulácia antibiotika spôsobená exkréciou cez koncentračný gradient.

V submerznej kultúre sú prítomné štyri typy buniek: septované hýfy, konédie, klíčiace konédie a artrospóry.

Morfológia je rozdielna v závislosti od použitého zdroja síry. Pri fermentácii s použitím DL-metionínu je prevaha artrospór, s existenciou ktorých je spojená maximálna tvorba antibiotika. Pri použití anorganických zdrojov síry sú v submerznej kultúre v prevahe vláknité formy; hrúbka vlákna je menšia ako pri použití DL-metionínu.

Popisovaný kmeň bol získaný nasledujúcim spôsobom:

Pôvodný kmeň *Cephalosporium acremonium* WIS OP-163 bol spracovaný chemickým mutagénom N-nitrozometylbiuretom. Najlepší izolát pracovne označený 8c VULM produkoval v submerznej kultivácii 1 800 až 2 000 µg/ml cefalosporínu C.

Izolát 8c VULM bol v ďalšej fáze vystavený pôsobeniu ŤV žiarenia. Získané izoláty boli hodnotené rýchlou screeningovou metódou na valčekoch z agarizovanej živnej pôdy s rôznymi zdrojmi síry. Valčeky s vyrastenými kolónami na povrchu boli testované na agarovej platni s testovacím mikroorganizmom *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750, špecifickým pre cefalosporín C.

Izolát s najväčším priemerom inhibičnej zóny na agarizovanej pôde s tiosíranom sodným bol ďalej testovaný v baničkovej fermentácii a v laboratórnych fermentoroch. Izolát mal pracovné označenie 188 VULM, aktivita cefalosporínu C vo filtrátoch fermentačnej pôdy bola stanovená

v 168. kultivačnej hodine spektrofotometrickou metódou /Claridge C. A., Vaughan R. W.: Antimicrob. Agents Chemother., 1969, 131/ a metódou HPLC /vypracovaná VÚLM/. Genealogická schéma kmeňa je označená ako schéma č. 1. Izolát 188 VULM je uložený v Čs. sbírke mikro-organizmu ÚJEP v Brne pod číslom CCM F-729.

Posôbenie chemického mutagénu.

Kmeň OP 163 WIS bol deponovaný vo forme lyofilizovanej konzervy alebo krátkodobe na šikmom agare /sporulačná pôda označená NB-II; zloženie uvedené v ďalšom texte. Zo šikmého agaru bola pripravená vodná suspenzia o koncentrácii 10^5 až 10^6 konídií/ml. Suspenzia bola prefiltrovaná cez vrstvu vaty. Mutagén N-nitrozometylbiuret bol pridaný v koncentrácii 0,4 % k suspenzii konídií.

Mutagén bol v kontakte s kultúrou počas jednej hodiny na trepacom stroji /4Hz/ pri teplote 27°C . Po uplynutí expozície boli zo zmesi mutagén-kultúra pripravené riedenia 10^{-2} až 10^{-3} konídií/ml. Nariedenými suspenziami boli očkované Petriho misky s agarovou pôdou NB-II. Ako kontrola slúžila suspenzia spór bez prídania mutagénu.

Operácie s mutagénom prebiehali bez prístupu denného svetla. Spoluprácia na Petriho miskách trvala pri teplote 27°C 11 dní. Jednotlivé kolónie boli prenesené na šikmý agar NB-II a odskúšané na produkčnú aktivitu na baničkách.

Pôsobenie fyzikálneho mutagénu:

Z kultúry na šikmom agare bola pripravená suspenzia konídií zmytím povrchu 10 ml sterilnej vody. Suspenzia bola prefiltrovaná cez vatový filter; zo základnej suspenzie boli pripravené pracovné riedenia 10^{-12} až 10^{-13} konídií/ml, ktorými boli naočkované Petriho misky /pôda NB-II/. Zdrojom žiarenia bola germicídna UV-lampa /Philips TUV 30W, vlnová dĺžka 253,7 nm sa podieľa na celkovej spektrálnej energii 93,5 %/.

Povrch agaru s nanesenými konídiami bol exponovaný počas 1 minuty zo vzdialenosti 30 cm. Po ožiarení boli Petriho misky umiestnené v termostate, kde kultúra sporulovala 11 dní pri teplote 27°C . Z vyrastených kolónií boli ihlovou technikou prenesené spóry na povrch agarových valčekov-bločkov.

Po 5 dňoch bol povrch bločkov pokrytý kultúrou. Bločky boli umiestnené na sklenené platne s agarovou pôdou s obsahom 25 % kultúry *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750. Inkubácia bločkov trvala 18 hodín pri teplote 37°C . Hodnotenie izolátov bolo založené na meraní inhibičných zón v okolí bločkov. Najlepší izolát bol z pôvodnej kolónie na Petriho miske vyočkovaný na šikmý agar NB-II a odskúšaný v laboratórnej aj štvrtéprevádzkovej fermentácii.

Agarová pôda NB-II	hmot./obj.
Basto-beef extrakt	0,3
Bacto-pepton	0,5
glukóza	1,0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,005
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,005
DL-metionín	0,005
L-cystein	0,005
agar Difco	2,5
pH pôdy pred sterilizáciou	-6,8.

Príprava vegetatívneho inokula:

Používali sa 500 ml banky plnené 60 ml inokulačnej pôdy o zložení:

sacharóza	1,5 % hmot./obj.
kukuričný výluh	0,5
octan amonný	0,5
sojový olej	0,2
pH pred sterilizáciou sa upravuje na 7,0.	

Na očkovanie sa používa kultúra zo šikmého agaru alebo z jačmenných zrn, tzv. jačmenné konzervy. Príprava vegetatívneho inokula trvá 72 hodín pri teplote 27 °C na trepacom stroji /4 Hz/. Vegetatívnym inokulom sa očkujú produkčné pôdy rozplnené v 500 ml bankách po 40 ml o zložení:

kukuričný škrob	5,0 % hmot./obj.
arašidová múka	7,0
sacharóza	0,5
glukóza	1,25
CaCO ₃	0,5
Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	0,9
borax	0,05
kašalotový olej	2,8

Na očkovanie sa používa 8 % obj./obj. vegetatívneho inokula. Kultivácia má podmienky totožné s prípravou vegetatívneho inokula, dĺžka kultivácie 168 hodín. Porovnanie produkčnej aktivity kmeňa *Cephalosporium acremonium* WIS OP-163 s izolátmi 8c VULM a 188 VULM je v tabuľke 1. Porovnané sú výsledky dosiahnuté v baničkovej fermentácii:

T a b u l k a 1

číslo experimentu	kmeň	prod. aktivita /μg/ml/ CFS-C
1	WIS OP-163	350
	8c VULM	1 860
2	8c VULM	1 930
	188 VULM	4 000
3	188 VULM	4 000
	9 VULM	1 680

Kmeň používaný vo fermentácii s použitím DL-metionínu ako zdroja síry.

V laboratórnych sklenených tančikoch /Výv. dielne ČSAV/, objem 2 litre, pracovný objem 1 liter, bola pri podmienkach: vzdušenie 0,75 objemu vzduchu/objem pôdy, miešanie 10 Hz, teplota do 24 kultivačnej hodiny 28 °C, potom do konca fermentácie 23 °C, dosiahnutá produkčná aktivita 5 200 μg/ml za 168 hodín kultivácie.

Morfológia kmeňa:

Morfológiu kmeňa *Acremonium chrysogenum* CCM F-729 je možné popísať nasledujúcim spôsobom: Pri monokolóniovom rozseve tvorí krémové v strede béžovo sfarbené kolónie o priemere 5 až 7 mm. Povrch kolónie je silne vrásčitý, okraje radiálne zbrázdnené, stred kolónií je vyvýšený

cca 3 mm, tvorí nepravidelný kráter. Septované hýfy majú hrúbku 1,5 až 2,0 μm . Mycélium je svetlo sfarbené. Konídie sú tvaru pretiahnutej elipsy, zachovávajú si hrúbku pôvodnej hýfy, ich dĺžka je 5 až 6 μm /často sú obalené hlienom/ Kmeň je uchovávaný vo forme konzervy na zmesi hlina-piesok ako lyofilizovaná konzerva, ako šikmý agar na pôde NB-II a ako konzerva na sypkom substráte, ktorým je lúpaný jačmeň. Kmeň je stabilizovaný pri pasážovaní šikmý agar-vegetatívne inokulum-sypký substrát-vegetatívne inokulum, ako aj pri pasážovaní šikmý agar-sypký substrát-sypký substrát-vegetatívne inokulum. Všetky materiály sú deponované pri 5 °C, šikmé agary a jačmenné konzervy po dobu 4 mesiacov.

Genealogická schéma kmeňa *Acremonium chrysogenum* CCM F-729

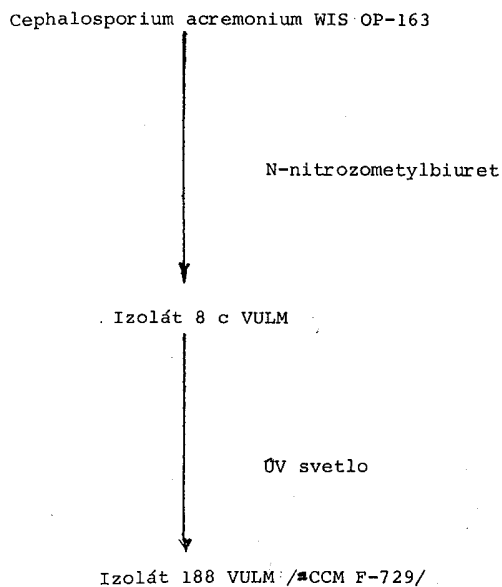
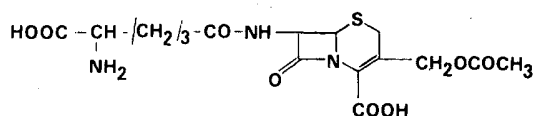


Schéma č. 1

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Kmeň mikroorganizmu *Acremonium chrysogenum* /Thirum et Sukap/W. Gams CCM F-729 produkuje kyselinu 7- β -D-5-amino-5-karboxy-n-valeramido/-3-acetoxymetyl-3-cefem-4-karboxylovú tzv. cefalosporín C vzorca 1.



/I/