



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

229550

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 15/00

[22] Prihlášené 16 03 83
[21] (PV 1815-83)

[40] Zverejnené 15 09 83

[45] Vydané 15 08 86

(75)
Autor vynálezu

WELWARD LADISLAV ing. CSc., BANSKÁ BYSTRICA, MARTVOŇ
AUGUSTÍN doc. ing. CSc., KOŠALKO RUDOLF ing. CSc., BRATISLAVA,
ROLKO PAVEL ing., RAKYTA JÁN ing., POTANČOKOVÁ MARTA,
DUDEK MARCEL ing., BANSKÁ BYSTRICA

(54) Kmeň mikroorganizmu *Acremonium chrysogenum* CCM F-744

1

Vynález sa týka kmeňa mikroorganizmu *Acremonium chrysogenum* CCM F-744, produkujúceho cefalosporín C.

Tento kmeň bol získaný z kmeňa *Acremonium chrysogenum* CCM F-644 šľachtením zameraným na zvýšenie produkcie cefalosporínu C. Východzí kmeň pred šľachtením dosahoval produkčnú aktivitu na baničkách 3300 až 4000 µg/ml.

Produkčné mikroorganizmy *Acremonium chrysogenum* majú eukariotický organizmus s membránou ohraničujúcou jadro, s chromozomálnou organizáciou a s cytoplazmou s pomerne komplexnou štruktúrou — mitochondrie — endoplazmatické retikulum. Základnou bunečnou formou sú hýfy s pre-pážkami — septami. Kmeň sa reprodukuje nepohlavne mitózou a bunečnou elongáciou — predlžovaním.

Popisovaný kmeň bol získaný tak, že materský kmeň *Acremonium chrysogenum* CCM F-644 bol vystavený mutagénnemu pôsobeniu UV-svetla a pôsobeniu metabolitov s preferenciou izolátov rezistentných na feedback kontrolu syntézy antibiotika, inhibíciu konocovým produktom — antibiotikom.

2

Schematický postup šľachtenia je uvedený v priloženej tabuľke č. 1.

Metodika pôsobenia fyzikálneho mutagénu a metabolitov

Príprava suspenzie spór

Vysporulovaná kultúra produkčného kmeňa na šikmom agare v Endovej skúmavke na sporulečnej pôde NB-II sa zmyla 10 ml sterilnej vody, prefiltrovala cez vatovú zátku na pipete za účelom zbavenia hýf a artrospór. Z tejto suspenzie vhodne nariadenej sa očkovali Petriho misky s pôdou NB-II.

Zloženie pôdy NB-II

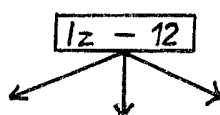
Bacto Beef extrakt 0,3 %, bacto peptone 0,5 %, glukóza 1 %, FeSO₄ · 7 H₂O 0,005 %, MgSO₄ · 7 H₂O 0,005 %, D,L-metionín 0,005 percenta, L-cystein 0,005 %, agar Difco 2,5 percenta.

Tabuľka č. 1

GENEALOGICKÁ SCHÉMA

CCM F-644

↓
UV 1'
Iz — 2
↓
UV 1'
Iz — 3
↓
UV 1'
Iz — 4
↓
UV 1'
Iz — 5
↓
UV 1'
Iz — 6
↓
UV 1'
Iz — 7
↓
UV 1'
Iz — 8
↓
UV 1'
Iz — 9
↓
UV 1'
Iz — 9
↓
UV 1'
Iz — 10
↓
UV 1'
Iz — 11
↓
metabolity



UV 1'

metabolity

UV 1'

Mutagénny zásah

Ako zdroj žiarenia sa použila germicídna UV-lampa 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 NB-II.

Vegetatívne inokulum sa pripravuje v 500-mililitrových varných bankách plnených 60 mililitrami pôdy IP-5 nasledujúceho zloženia: sacharóza 1,5 %, octan amónny 0,5 %, metyloléat 0,08 %, metionín 0,1 %, kukuričný výluh (100 %-ný) 0,8 %. Naočkovanie tejto pôdy sa robí kľučkou so spórmi zo šikmého agaru. Kultivácia trvá 72 hodín na

rotačnom trepacom stroji pri 220 obr/min a výstreďníku 25 mm pri teplote 28 °C. Z narasteneho vegetatívneho inokula sa 4 ml očkujú produkčné 500ml varné banky plnené 40 ml produkčnej pôdy PP-XIII nasledujúceho zloženia: kukuričný škrob 4,5 %, arašidová múka 6 %, sacharóza 0,5 %, glukóza 1,15 %, uhličitan vápenatý 1 %, D,L-metionín 1,7 %, metyloléat 2,5 %. Kultivácia na rotačnom trepacom stroji pri 28 °C 168 hodín.

Pasážovanie cez metabolity

Šlachtený kmeň sa po skončení kultivácie za submerzných podmienok na pôde PP-XIII ponechal vplyvu vlastných metabolitov staticky pri laboratórnej teplote 5 až 7 dní. Hladina hlavného metabolitu cefalosporínu C sa pri tomto pasážovaní postupne upravovala v jednotlivých pasážach až na hodnoty cca 20 000 µg/ml. Po uvedenej dobe sa urobil monokolóniový rozsev na Petriho misky s pôdou NB-II a v screeningu sa vybral najproduktívnejší jedinec.

Produkčné porovnanie kmeňa *Acremonium chrysogenum* CCM F-644 so získaným izolátom 12 VULM

Laboratórne baničkové pokusy — výsledky

Pokus č.	Kmeň	Produkčná aktivita µg/ml CFS-C
1	CCM F-644	3980
1	Iz 9 VULM	6160
1	Iz 11 VULM	7490
1	Iz 12 VULM	8230

Výraznejší efekt nového kmeňa Iz 12 VULM sa ukázal pri skúškach v laboratórnych fermentačných tančikoch plnených 2 litrami fermentačnej pôdy PP-XIII o 50 %. Vzdušenie bolo 1,2 objemu vzduchu na objem pôdy, miešania 900 obrátok/min, teplota 28 °C do 48 hodiny, potom až do konca 23 °C. V 168 hodine kultivácie sa dosiahlo 14 800 µg/ml.

Morfológia kmeňa

Kmeň *Acremonium chrysogenum* pracovného označenia 12 VULM tvorí pri monokolóniovom rozseve krémovo-béžové kolónie o veľkosti 6 až 9 mm za 11 dní za použitia pôdy NB-II. Okraje kolónie sú radiálne vráskované, tak isto ako samotná kolónia, pričom v strede kolónií je kráter. Kolónie majú elipsoidný tvar dĺžky 1,5 až 2,0 µ. Základné konzervy kmeňa sa uchovávaly na zmesi hlina—plesok a skladujú pri 5 °C, potom sa preočkávajú na šikmý agar s pôdou NB-II a odtiaľ na prevádzkové konzervy, ktoré sú buď Rouxove fľaše s pôdou NB-II, alebo sypký substrát — jačmeň. Agarové pôdy sa skladujú pri teplote 5 °C jeden mesiac, jač-

menné konzervy až 3 mesiace pri teplote
—15 °C.

Kmeň *Acremonium chrysogenum* Iz 12
VULM bol uložený v Československej zbier-

ke mikroorganizmov (Czechoslovak Collec-
tion of Microorganismus) Univerzita J. E.
Purkyně, Brno, třída Obránců míru 10, pod
číslo CCM F-744.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Kmeň mikroorganismu *Acremonium chrysogenum* CCM F-744 produkující cefalospo-
rin C.