



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

234 589

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 18 11 83
(21) (PV 8597-83)

(51) Int. Cl.³ C 12 N 1/14

(40) Zveřejněno 31 08 84
(45) Vydáno 01 01 87

(75)

Autor vynálezu

ZELENÝ KAREL dr. CSc., PRAHA,
MATELOVÁ VLASTA dr. CSc., ROZTOKY U PRAHY
ČULÍK KAREL dr.,
ULBERT STANISLAV ing.,
PILÁT PETR ing. CSc.,
BÁRTA MIROSLAV dr., PRAHA

HOFFBAUER HENRICH ing.,

MIKLÁŠ EMIL ing.,

BUČKO MICHAL ing. CSc.,

OKÁNIK BORIS ing.,

BULLA JÁN ing.,

VARGA VLADIMÍR ing., BANSKÁ BYSTRICA

(54)

Kmen mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* CCM F-753

Kmen mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* CCM F-753 (Cu P-2) produkujícího ve zvýšené míře penicilin V, penicilin G a 6-aminopenicilánovou kyselinu (6-APK). Předností tohoto kmene je značná odolnost na mechanické namáhání při míchání ve fermentační nádobě.

Vynález se týká kmene mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* CCM F-153 (Cu P-2) produkujícího ve zvýšené míře penicilin V, penicilin G a 6-aminopenicilánovou kyselinu (6-APK). Předností tohoto kmene je značná odolnost na mechanické namáhání při míchání ve fermentační nádobě.

Výroba penicilinu se realizuje ve výrobních fermentačních tancích více než 30 let a její objem se neustále zvětšuje. Zvýšení výroby souvisí s nároky na objem výroby polosyntetických penicilinů odvozených od 6-aminopenicilánové kyseliny. Zvýšení výroby může být realizováno rozšiřováním výrobních fermentačních provozů nebo zvyšováním výtěžnosti fermentačního procesu. Druhá alternativa, která nevyžaduje významné investiční náklady, je umožněna buď zlepšením fermentačních podmínek na základě dokonalějšího řízení fermentačního procesu nebo zvýšením produkční schopnosti kmenů používaných pro biosyntézu. Šlechtitelské linie kmenů pro biosyntézu penicilinu jsou dlouhodobě vedeny řadou zavedených postupů.

Kmen *Penicillium chrysogenum* CCM F-153 (Cu P-2) byl získán z kmene *Penicillium chrysogenum* evid.číslo 2/170 řadou opakovaných mutagenních zásahů (nitrosometylmočovina, nitrosometylguanidin, UV-světlo, p-fluorofenylalanin) a následných pravidelně zařazovaných pasivních selekcí. Izoláty byly hodnoceny dle následujícího schématu:

izolované kolonie na Petriho misce



šikmý agar



vegetativní inokulum



vlastní fermentace.

234 589

Izoláty byly hodnoceny ve dvou pokusech před lyofilizací (konzervací) a ve třech pokusech po lyofilizaci. Lyofilizované konzervy slouží k dlouhodobému uchovávání sporového materiálu a umožňují zachování vhodných růstových a produkčních vlastností.

Stanovení účinnosti penicilinu bylo prováděno automatizovaným systémem při použití hydroxamátové polarimetrické metody.

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

Kmen *Penicillium chrysogenum* CCM F-153 (Cu P-2) tvoří při monosporickém rozsevu na sporulační půdě typu glycerin-melasa kolonie velikosti 7,5 až 10 mm během 10 až 12 dnů kultivace při 25°C. Na okraji tvoří radiální vrásky, střed kolonie je proláklý, okraj kolonie je lemován bílou nesporulující zónou. Spory mají kulovitý až elipsoidní tvar obvyklých rozměrů, při mikroskopickém sledování jsou bezbarvé. Kultura dobře sporuluje na různých typech sporulačních půd, na přírodních substrátech (proso, kukuřice, ovesné kroupy tad.), zejména při obohacení přírodních substrátů zdrojem dusíku, nejlépe ve formě 1%ního roztoku přípravku Pharmamedia. Barva vysporulované kultury je šedo zelená.

Kmen *Penicillium chrysogenum* CCM F-153 (Cu P-2) je dostatečně stabilní, a to jak při vegetativním pasážování (neztrácí produkční schopnosti pasáží do 4. generace), tak při dlouhodobém uchovávání v lyofilizované formě.

Příklad 1

Biosyntéza penicilinu V.

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

Vegetativní inokulum bylo očkováno kličkou spor ze šikmého agaru a kultivováno na rotačním třepacím stroji 48 hodin.

Takto připraveným vegetativním inokulům byly očkovány fermentační baňky o obsahu 500 ml se 40 ml fermentační půdy. Zdrojem uhlíku byla laktóza a sojový olej v kombinaci s přidávanou sacharózou, zdrojem uhlíku byla sojová mouka, případně Pharmamedia, půda dále obsahovala fenoxycetovou kyselinu, jako prekurzor postranního řetězce pro biosyntézu penicilinu V, křídou a zdroj síry.

Příprava vegetativního inokula i vlastní fermentace byly prováděny na rotačních třepacích strojích při 230 obr./min., výšednost 25 mm při teplotě 25°C.

Produkční hodnocení izolátů bylo opakováno 2x až 3x, načež nejlepší izoláty byly lyofilizovány a po vyočkováání opětne minimálně 3x produkčně hodnoceny.

Těmito fermentačními postupy jsou dosahovány produkce při použití kmene *Penicillium chrysogenum* CCM F- (Cu P-2) na úrovni 20 až 26 000 j. penicilinu V/ml podle použitého fermentačního média a fermentačního postupu.

Příklad 2

Biosyntéza penicilinu G.

Fermentace kmene *Penicillium chrysogenum* CCM F- (Cu P-2) pro biosyntézu penicilinu G byly provedeny analogicky s postupy pro biosyntézu penicilinu V. Rozdíl spočíval pouze v tom, že půda neobsahovala fenoxycetovou kyselinu jako prekurzor postranního řetězce, ale sodnou sůl fenylacetové kyseliny, která vzhledem k vyšší toxicitě je dávkována v průběhu fermentace ve formě drážé nebo roztoku. Dosahované produkce v laboratorním měřítku se pohybovaly od 17 do 19 000 j. penicilinu G/ml.

Příklad 3

Biosyntéza 6-APK.

Fermentační postup pro biosyntézu 6-APK je analogický postupu podle příkladu v bodě 1. Rozdíl je pouze v tom, že půda neobsahovala žádný prekurzor postranního řetězce, tj. neobsahova-

la fenoxycetovou ani fenylacetovou kyselinu. Získané produkce jsou na úrovni 13 až 15 000 j. 6-APK/ml.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

(ccm F-753,)

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