



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY

A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

239 242

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 08 06 84
(21) PV 4359-84

(51) Int. Cl.⁴

C 12 P 37/00,
C 12 R 1/82

(40) Zveřejněno 15 05 85
(45) Vydáno 01 08 87

(75)
Autor vynálezu

ZELENÝ KAREL dr.CSc., PRAHA; MATELOVÁ VLASTA dr.CSc., ROZTOKY U PRAHY;
ULBERT STANISLAV ing.; PILÁT PETR ing. CSc.;
BÁRTA MIROSLAV dr., PRAHA; OKÁNIK BORIS ing.;
BUČKO MICHAL ing. CSc.; VARGA VLADIMÍR ing.;
MIKLÁŠ EMIL ing.; BULLA JÁN ing., BANSKÁ BYSTRICA

(54)

Kmen mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* CCM F-760

Kmen mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* CCM F-760, produkující penicilin G a V. Tento kmen umožňuje zvýšenou produkci penicilinů při submersní fermentaci, je odolný vůči mechanickému namáhání, rychle roste na tuhých i kapalných médiích a je vysoce stabilní v následných sporových generacích.

239 242

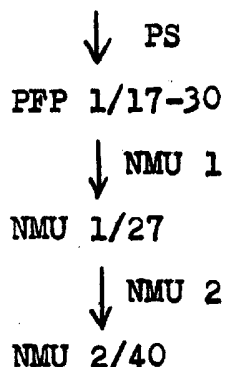
Vynález se týká kmene mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* CCM F-460 produkujícího penicilin G a V.

Přesto, že výroba penicilinu probíhá ve výrobních fermentačních tancích více než 30 let, dochází k neustálému zvyšování objemu vyrobeného penicilinu. Celkové zvýšení výroby může být dosaženo buď zvětšováním výrobní kapacity, nebo zvýšením výtěžku penicilinu při jeho výrobě. V současné době je druhý způsob jedinou možnou cestou zvýšení výtěžku, kde hlavním přínosem je zlepšení produkčních vlastností kmene. Tyto kmeny jsou získávány řadou zavedených postupů v dlouhodobých šlechtitelských programech. Výsledné kmeny vykazují pak řadu významných odlišných vlastností, z nichž nejdůležitější jsou ty vlastnosti, které se projevují ve zvýšené produkci penicilinu ve velkoobjemových fermentorech.

Kmen *Penicillium chrysogenum* CCM F-460

byl získán působením mutagenů a opakovanými pasivními selekcemi na výchozí kmen N 9541. Způsob šlechtění kmenů je znázorněn na následujícím schémátu, kde je uvedena genealogická linie vedoucí ke kmeni, na nějž je uplatňován patentový nárok.

Penicillium chrysogenum N 9541
↓ PS
9541-16
↓ UV 1
UV 1/47
↓ PFP 1
PFP 1/17
↓



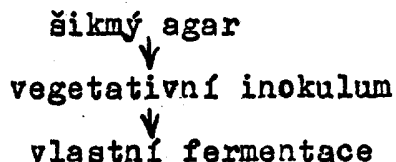
239 242

Zkratky: PS - pasivní selekce - selekce bez působení mutagenu
UV - působení UV-záření
PFP - působení parafluorofenylalaninu
NMU - působení nitrosometylmočoviny.

Poslední mutagenní působení bylo na kmen interního označení NMU 1/27. Použitý mutagen NMU byl aplikován v koncentraci 6 mg/ml směsi pufrované citrátfosfátovým pufrem. Během působení byla mutagenní směs míchána na elektromagnetickém míchadle při 25°C. V časových intervalech byly odebírány vzorky a ředěny až na neúčinnou koncentraci.

Spory pro pasivní selekci byly suspendovány v destilované vodě, ředěny ředící řadou s faktorem 10 a očkovány na Petriho misky se sporulační půdou. Po 14denní inkubaci při teplotě 25°C byly izoláty vysporulovány a bylo možné je přeočkovat na šikmé agary. Inkubace tohoto základního sporulačního materiálu probíhala při téže teplotě 9 dnů.

Výše uvedeným způsobem aplikace mutagenů a pasivních selekcí byl získán izolát NMU 2/40. Izoláty byly hodnoceny podle následujícího schématu:



Izoláty byly hodnoceny ve 2 pokusech před lyofilizací a ve 3 pokusech po lyofilizaci. Lyofilizované konzervy slouží k dlouhodobému uchovávání sporového materiálu a umožňují zachování vhodných růstových a produkčních vlastností kmene.

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

Kmen tvoří při monosporickém rozsevu na sporulační půdě typu glycerin-melasa kolonie velikosti 20-22 mm se zvýšeným středním valem o průměru 5 až 6 mm během 7 až 10 dnů kultivace při 25°C. Směrem od valu k okraji kolonie se vytvářejí nepravidelné radiální vrásky. Na minimální půdě typu Czapek-Dox se vytvářejí kolonie o velikosti až 25 mm, kde střední část tvořená valem je průměru 3 až 5 mm. Na okraji kolonie i na této půdě se vytvářejí radiální vrásky, které nejsou tak zřetelné jako na sporulační půdě typu glycerin-melasa. Barva vysporulované kolonie je na sporulační půdě béžová, starší kolonie začínají tmavnout, na minimální půdě Czapek-Dox jsou kolonie bílé a při stárnutí se směrem do středu projevuje odstín béžové. Kmen patří mezi kmeny rychle rostoucí při všech používaných teplotách pro kmeny druhu *Penicillium chrysogenum*, a to jak na tuhých, tak v kapalných médiích.

Předností kmene je vysoká stabilita v následných sporových generacích. Tento kmen bez jakéhokoli výrazného produkčního poklesu snáší přeočkování až do 4. generace.

Kmen je tolerantní ke zvýšeným koncentracím penicilinu přidaného do média na počátku fermentace.

Vhodnou vlastností kmene je zlepšená konverze hlavního zdroje uhlíku - sacharózy na penicilin.

Další významnou vlastností kmene je jeho tolerance k mechanickému namáhání, kterému je kultura podrobena během míchání ve fermentační nádobě. Při vysokém mechanickém namáhání dochází u tohoto kmene k minimálnímu poškození vláken mycelia. Tato výhoda je uplatněna speciálně při velkoobjemových fermentacích. Hlavní a nejvýznamnější vlastností kmene *Penicillium chrysogenum* CCM F- 760 je zvýšená produkce penicilinu při submersní fermentaci.

Příklad 1

Fermentace v baňkách na rotačních třepacích.

Vegetativní inokulum bylo připravováno submersně v 500 ml varných baňkách se 40 ml inokulační půdy (zdroj uhlíku sacharóza, dusíku kukuričiny výluh, síran amonný a anorganické sole). Půda pro přípravu vegetativního inokula byla zaočkována kličkou spor ze šikmého agaru a inkubována na rotačním třepacím stroji 30 až 40 hodin.

Takto připraveným vegetativním inokulem byly očkované fermentační baňky obsahu 500 ml, objem fermentační půdy 40 ml (zdroj uhlíku laktóza a glukóza, zdroj dusíku kukuřičný výluh, sojová mouka a amoniakální sůl, prekursor postranního řetězce, anorganické sole, uhličitán vápenatý a zdroj síry). Fermentace probíhaly 9 dnů, maximální produkce bylo zpravidla dosahováno v 8.dnu kultivace. Produkce penicilinu za výše uvedených podmínek dosahovala 25 000 j./ml.

Příklad 2

Fermentace v poloprovozních fermentorech.

Fermentace v poloprovozních fermentorech objemu 250 l byla třístupňová. Předočkovací půda obsahovala jako zdroj uhlíku sacharózu, zdrojem dusíku byly kukuřičný výluh, bavlníková mouka a anorganický zdroj, dalšími složkami půdy byly rozpustné sole a uhličitán vápenatý. Očkovací půda měla stejné složení. Fermentační půda obsahovala sacharózu, kukuřičný výluh, bavlníkovou mouku, prekursor postranního řetězce a další sole.

Fermentační tank byl plněn 150 l půdy a inokulován 10 % objemovými z očkovacího fermentoru, fermentační teplota 25°C, míchání 300 až 320 ot./min., vzdušnění 150 až 180 l /min., doba fermentace 200 hodin. Průběh fermentace byl řízen dávkováním zdrojů uhlíku, dusíku, fosforu a prekursoru.

Zvětšující se objem fermentační půdy a růst kultury byly kompenzovány a udržovány pomocí odběrů půdy a příslušným ředěním. Takto řízenou fermentací bylo ve fermentoru dosaženo ve 174.hodině hladiny penicilinu 38 000 j./ml, ekonomický koeficient dosáhl hodnoty 0,140 mia/m³.hod. a bylo dosaženo velmi příznivých parametrů konverze sacharózy na penicilin (5,8 kg/kg).

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

239 242

Kmen mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* CCM F-760
produkující penicilin V a G.