



ÚRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

251533
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 1/14

(22) Prihlásené 26 07 85
(21) (PV 5510-85)

(40) Zverejnené 13 11 86

(45) Vydané 15 08 88

[75]

Autor vynálezu

DOBIAS JOZEF ing. CSc., BRTKO JÚLIUS ing. CSc.,
SADLOŇ JAROSLAV ing., BÁLINT ŠTEFAN ing. CSc., BRATISLAVA

(54) Kmeň mikroorganizmu *Aspergillus tamarii* CCM F-780

1

2

Riešenie sa týka nového kmeňa *Aspergillus tamarii* CCM F-780, ktorý produkuje kyselinu kójovú vo zvýšenom výťažku.

Podstata šľachtenia a získania nového kmeňa spočíva v tom, že na suspenziu spór *Aspergillus tamarii* o koncentrácii 10^6 /ml v dimetylsulfoxide sa pôsobí γ -lúčmi pri laboratórnej teplote po dobu 25 až 35 minút, pričom sa izolujú získané mutanty štandardnými selekčnými metódami.

Vynález sa týka nového kmeňa *Aspergillus tamarii* mutant III, ktorý produkuje kyselinu kójovú vo zvýšenom výťažku.

Kmeň *Aspergillus tamarii* sa popisuje ako producent kyseliny kójovej už dávnejšie, avšak bez udania množstva produkovanej kyseliny [Korzybski, T., Kowszyk — Gindifer, Z. Kurylowicz, W.: Antibiotics, PWN — Polish Scientific Publishers, Warszawa, (1967)].

Podľa literárnej rešerše kmeň *Aspergillus tamarii* sa na priemyslovú výrobu kyseliny kójovej nepoužíva. Katalógy kultúr húb (Catalogue of Cultures, Univerzita Karlova, Praha 1976, č. 664 *Aspergillus tamarii* Kita; ATCC Catalogue of Fungi Yeasts, 16-th edition, 1984 čísla 1 005, 10 836, 12 699, 16 865, 20 054, 26 950, 26 951 *Aspergillus tamarii* Kita) uvádzajú druh *Aspergillus tamarii* bez vlastností produkovať kyselinu kójovú. U nás nie sú k dispozícii vysoko-produkčné kmene húb, ktoré sú schopné vytvárať kyselinu kójovú.

Uvedené nedostatky doteraz známych kmeňov odstraňuje vynález, ktorý je nový kmeň mikroorganizmu *Aspergillus tamarii* mutant III uložený v Československej zbierke mikroorganizmov Univerzity J. E. Purkyně v Brne, Třída Obránců míru 10, pod označením CCM F-780. Nový kmeň sa získal tak, že na suspenziu spór *Aspergillus tamarii* o koncentrácii $10^6/\text{ml}$ v 10 %-nom dimetylsulfoxide sa pôsobilo γ -lúčmi po dobu 25 až 35 minút, suspenzia spór sa rozliala na sladinkový agar a nechala vysporulovať pri teplote 25 až 30 °C, z vysporulovanej kultúry sa pripravila suspenzia spór, ktorá sa riedila 1 : 1 000, rozliala na sladinkový agar, kde vyrástli kolónie kultúry mikroorganizmu, ktoré sa hodnotili fermentačnými skúškami z hľadiska produkcie kyseliny kójovej a z nich bol vybraný kmeň *Aspergillus tamarii* mutant III.

Hlavnou výhodou nového kmeňa je zvýšená produktivita, ktorá dosahuje hodnoty 33 kg kyseliny kójovej na 100 kg cukru. Pôvodný kmeň *Aspergillus tamarii* mal maximálnu produkciu kyseliny kójovej 15 až 18 kg na 100 kg cukru. Tento kmeň na Sabouraudovej pôde za 3 dni vytvára kolónie o priemere 2,6 cm, vrchná strana je biela so silnou sporuláciou v strede kolónie. Spodná strana je slabo oranžová. Spóry sú tmavohnedej farby 7 až 8 μm v priemere, vezikulum výrazne guľatý v priemere 44 až 48 μm .

Nový kmeň *Aspergillus tamarii* mutant III dobre rastie na Sabouraudovej agarovej pôde. Za 3 dni vytvára kolónie o priemere 3 cm, vrchná strana je biela so slabo sporuluje. Spodná strana je oranžovo-hnedá a hladká. Na sladinkovom agare vytvára za 3 dni kolónie o priemere 4 cm bez sporulácie, vrchná strana je biela, spodná strana je radiálne zvrásnená a oranžovej farby. Sporulácia na sladikovom agare

sa objavuje po 5 dňoch kultivácie. Spóry sú tmavohnedej farby, 7 až 8 μm v priemere, vezikulum výrazne guľatý o priemere 46 až 50 μm . Životnosť spór je dlhodobá pri skladovaní v suspenzii s aktívnym uhlím, v parafínovom oleji, alebo v lyofilizovanom stave aj niekoľko rokov.

Príklad 1

Na suspenziu spór *Aspergillus tamarii* o koncentrácii $10^6/\text{ml}$ v 10 %-nom dimetylsulfoxide sa pôsobí γ -lúčmi zo zdroja ^{60}Co po dobu 25 až 35 minút. Suspenzia spór sa potom rozleje na sladinkový agar a nechá vysporulovať v termostate pri teplote 25 až 30 °C. Z vysporulovanej kultúry sa pripraví suspenzia spór v 0,9 %-nom chloride sodnom, ktorá sa riedi 1 : 1 000 a rozleje na sladinkový agar, kde za 3 až 4 dni vyrastú kolónie kultúry mikroorganizmu, ktoré sa hodnotia fermentačnými skúškami na produkciu kyseliny kójovej a z nich sa vybral kmeň *Aspergillus tamarii* mutant III.

Príklad 2

Prípraví sa kultivačné médium, na 1 liter sa použije 100 g glukózy, 0,16 g dihydrofosforečnanu draselného, 0,07 g chloridu sodného, 0,02 g tetrahydrátu síranu manganatého, 1 g močoviny, 1 g chloridu amónneho, 0,01 g heptahydrátu síranu zinočnatého a 0,01 g heptahydrátu síranu železnatého. Sterilné kultivačné médium o pH 5,0 až 6,5 v 5 l fermentačnom tanku sa zaočkuje s 10 % obj. 48 hodinového vegetatívneho inokula *Aspergillus tamarii* mutant III a kultivuje pri teplote 30 °C, pri obvodovej rýchlosti 3,1 ms^{-1} a vzdušnení 3 VVM po dobu 7 až 8 dní. V priebehu fermentácie sa vytvára v médiu 33 g/l kyseliny kójovej.

Príklad 3

Izolovaný kmeň má tú vlastnosť, že jeho mycélium po oddelení od fermentačnej tekutiny je možné použiť niekoľkokrát za sebou na fermentačnú prípravu kyseliny kójovej. Prípraví sa roztok 130 g glukózy v 1 l 0,1 M fosfátového tlmiaceho roztoku o pH 6,0. Sterilný roztok v 5 l fermentačnom tanku sa zmiešal s mycéliom, ktoré sa získalo separovaním od fermentačného média po skončenej fermentácii popísanej v príklade 2. Podmienky fermentácie sú také isté ako v príklade 2. Po 5 až 6 dňoch kultivácie sa v médiu vytvára 19 až 21 g/l kyseliny kójovej.

Kmeň *Aspergillus tamarii* mutant III môže sa využiť pri fermentačnej výrobe kyseliny kójovej, ktorá slúži ako surovina pre chemický, potravinársky a farmaceutický priemysel.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Kmeň mikroorganismu *Aspergillus tamarii* CCM F-780 produkující kyselinu kójovou.