



URAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

223616
(11) (B1)

[51] Int. Cl.³
C 12 P 1/06

(22) Přihlášeno 15 09 81
(21) [PV 6790-81]

(40) Zveřejněno 28 01 83

(45) Vydáno 15 03 86

(75)
Autor vynálezu

VANĚK ZDENKO RNDr. PhMr. DrSc., KRUMPHANZL VLADIMÍR prof. ing.
DrSc., PRAHA. ŠEVČÍK BOHUMIL prof. MVDr. DrSc., POHOŘÍ-CHOTOŮN,
BĚLÍK EDUARD ing. CSc., KOUŘIM, BEDRNÍK PETR RNDr. CSc.,
KRÁLOVCOVÁ EMANUELA ing., STAJNER KAREL PhMr., KARNETOVÁ
JAROSLAVA RNDr., TAX JIŘÍ RNDr., KLÁNOVÁ KATEŘINA RNDr.,
PRAHA

(54) Způsob přípravy monensinu B

1

2

Předmětem vynálezu je způsob přípravy kokeidiostatického antibiotika monensinu B, podle kterého se kultivuje mutantní kmen *Streptomyces cinnamonensis* 179, uložený ve sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně v Brně pod č. CCM 3504, v submersní kultuře při 25 až 42 °C 3 až 6 dní v kapalném živném prostředí, které obsahuje v hmotnostní koncentraci

glukózu	1 až 6 %
sójovou mouku	1 až 2 %
síran železitý	0,02 až 0,2 %
uhličitan vápenatý	0,3 %
chlorid sodný	0,3 %
propionát sodný	0,1 až 0,4 %

načež se výsledný produkt izoluje známým způsobem.

Vynález se týká způsobu přípravy monensinu B fermentací kmene *Streptomyces cinnamonensis* sp. 179.

Při výrobě monensinu [kokcidistatického antibiotika A 3823] podle US patentu číslo 3 501 568 fermentací kmene *Streptomyces* ATCC 15413 vzniká komplex 4 monensinových antibiotik A, B, C, D, které se liší svojí biologickou aktivitou.

Způsobem přípravy monensinu podle vynálezu bylo změnami ve složení fermentační půdy dosaženo regulace tvorby jednotlivých složek komplexu tak, že vzniká v převážné míře pouze monensin B.

Předmětem vynálezu je tedy způsob přípravy monensinu B, jehož podstatou je, že se kultivuje mutantní kmen *Streptomyces cinnamonensis* 179, uložený ve Sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně v Brně pod č. CCM 3504, v subsmerzní kultuře při 25 až 42 °C 3 až 6 dní v kapalném živném prostředí, které obsahuje v hmotnostní koncentraci

glukózu	1 až 6 %
sójovou mouku	1 až 2 %
síran železitý	0,02 až 0,2 %
uhličitan vápenatý	0,3 %
chlorid sodný	0,3 %
propionát sodný	0,1 až 0,4 %

načež se výsledný produkt izoluje známým způsobem.

Dále je uveden příklad způsobu přípravy podle vynálezu.

Příklad

Příprava monensinu B submerzní fermentací na živné půdě s propionátem sodným.

Spory mutantního produkčního kmene *Streptomyces cinnamonensis* 179 se naočkují na šikmý živný agar následujícího složení v hmotnostní koncentraci

kvasičný extrakt	0,4 %
sladinový extrakt	1,0 %
glukóza	0,4 %
oxid agar	3,0 %
voda dest.	do 1 l
pH	7,3

Zaočkováná půda se kultivuje při 28 °C 10 dní. Spory se smyjí 10 ml sterilní dest. vody a 1 ml získané suspenze se očkuje 50 mililitry inokulační půdy v 500 ml varných baňkách.

Inokulační půda má následující složení v hmotnostní koncentraci

sójová mouka	1,5 %
glukóza	2,5 %
CaCO ₃	0,3 %
NaCl	0,3 %

Fe ₂ (SO ₄) ₃	0,03 %
voda	do 1 l
pH	6,4

Půda před očkováním se sterilizuje při 120 °C a tlaku 100 kP po dobu 35 min. Zaočkováne inokulační baňky se kultivují 20 až 24 hodin při 38 °C na rotační třepačce o frekvenci 168 kyvů za min. Produkční baňky se očkují 2 % obj. inokula.

Složení produkční půdy v hmotnostní koncentraci

sójová mouka	1,5 %
glukóza	5,0 %
propionát sodný	0,2 %
CaCO ₃	0,3 %
Fe(SO ₄) ₃	0,03 %
pH	6,4

Naočkováná produkční půda v 500 ml varných baňkách se kultivuje při 38 °C, 120 hod. na výše popsané rotační třepačce.

Po skončení fermentace se upraví pH fermentační tekutiny 10% roztokem sody na hodnotu 8 až 9 a směs se zfiltruje. Filtrát se extrahuje 3X chloroformem a spojené extrakty se odpaří za vakua. Filtrační koláč se extrahuje 4X methanolem, filtráty se spojí, za sníženého tlaku se oddestiluje rozpouštědlo a odparek se dosuší. Odparky získané z filtrátu i koláče se rozpustí ve 100 ml methanolu, roztok se smísí se 100 ml 10 % hmot. vodného roztoku chloridu sodného a směs se extrahuje 3X vždy 100 ml petroletheru.

Petroletherové extrakty se spojí a protřepou 3X se 100 ml směsí methanolu s 10 procenty hmot. roztokem chloridu sodného v objemovém poměru 4 : 1. Vodně-methanolicke výtřepky se spojí a smísí s 10 % hmot. roztokem NaCl, takže výsledná směs obsahuje 40 objemových % roztoku NaCl. Tato směs se extrahuje 3X chloroformem, chloroformový extrakt se odpaří a dosuší za vakua. Získaný monensinový komplex obsahuje 75 % monensinu B.

Celkový obsah monensinů v submersních kulturách je stanovován spektrofotometricky takto: 4 ml submersní kultury se extrahuje 8 ml směsí hexan-chloroform (4 : 1), 1 ml získaného extraktu se zředí 5X butanolem a přidají se 2 ml vanilínového činidla (3 % vanilín v 1,5 % ethanolicke kyselině sírové). Směs se zahřívá 5 min. na vroucí vodní lázni a po ochlazení se ihned změřá absorbance při 526 nm. Množství monensinu se odečte z kalibrační křivky.

Jednotlivé faktory monesinového komplexu a jejich vzájemný poměr jsou určovány chromatografií na tenké vrstvě silikagelu (na deskách Silufol — Kavalier) v systému: heptan-ethylacetát-methanol (5 : 4 : 1 V/V/V). Detekce se provádí postřikem chromatogramu 3% roztokem vanilinu v 1,5% ethano-

lické kyselině sírové a následným záhřevem desky na 110 °C. Submersní kultura po skončení fermentace se extrahuje směsí hexan-chloroform (4 : 1) a extrakt se odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v malém množství chloroformu a použije pro nanášení na chromatogram.

Odparky získané způsobem popsaným v příkladu lze použít přímo pro přípravu monensinového premixu k výrobě medikovaných krmiv pro výkrm ve velkochovech.

V případě potřeby lze získat čistý monensin B. Odparek se rozpustí a odbarví aktivním uhlím a filtrát se dále čistí chromatografií na sloupci silikagelu známým způsobem.

K eluci se použije postupně chloroform a jeho směs s methanolem. Na základě výsledků TLC se spojí frakce obsahující žádaný faktor a z odparku se krystalizací ze směsi n-hexan-chloroform získá čistý produkt.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy monensinu B, vyznačený tím, že se kultivuje mutantní kmen *Streptomyces cinnamonensis* 179 CCM 3504, v submersní kultuře při 25 až 42 °C 3 až 6 dní v kapalném živném prostředí, které obsahuje v hmotnostní koncentraci

glukózu 1 až 6 %

sójovou mouku	1 až 2 %
síran železitý	0,02 až 0,2 %
uhličitan vápenatý	0,3 %
chlorid sodný	0,3 %
propionát sodný	0,1 až 0,4 %

načež se výsledný produkt izoluje známým způsobem.