



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

267 066

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 1/20

(21) PV 6445-86.S

(22) Prihlášené 05 09 86

(40) Zverejnené 12 01 89

(45) Vydané 14 12 90

(75)

Autor vynálezu

KVETKOVÁ MÁRIA RNDr., VIDO VLADIMÍR ing., ŽIGOVÁ EVELÍNA ing.,
BANSKÁ BYSTRICA, ŠEBEŠOVÁ VIERA, BRUSNO, BERTAN MILAN ing.,
BANSKÁ BYSTRICA

(54)

Kmeň mikroorganizmu *Streptomyces aureofaciens* CCM 3948

(57) Šľachtenie produkčných kmeňov *Streptomyces aureofaciens* produkujúcich chlór-tetracyklín je zamerané na trvalé zvyšovanie ich produkčnej schopnosti a odolnosti voči fágovej infekcii. Podľa popísaného postupu bol získaný kmeň *Streptomyces aureofaciens* CCM 3948 z produkčného kmeňa CCM 3820, ktorý produkuje vo zvýšenej miere chlór-tetracyklín bez príznakov citlivosti na aktínofág B1. Produkčné schopnosti kmeňa sa prejavujú pri nezmenenom doterajšom režime kultivácie.

Vynález sa týka kmeňa *Streptomyces aureofaciens* CCM 3948 (interné označenie kmeňa je NMM 84/16) so zvýšenou produkciou chlór-tetracyklínu, odolný voči fágovej infekcii.

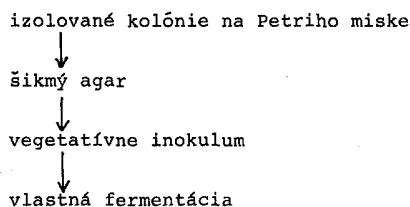
Prednosťou kmeňa podľa vynálezu je odolnosť voči fágovej infekcii, stabilita vlastností pri pasážovaní a pri dlhodobom uchovávaní v lyofilizovanej forme.

Zvýšenie výroby antibiotika chlór-tetracyklínu môže sa realizovať rozšírením výrobných fermentačných prevádzok, alebo zvýšením výťažností fermentačného procesu. Druhá alternatíva, ktorá nevyžaduje významné investičné náklady, je umožnená buď zlepšením fermentačného procesu, alebo zvýšením produkčnej schopnosti kmeňov používaných pre biosyntézu.

Používané kmene sa tiež musia vyznačovať odolnosťou voči vážnemu nebezpečenstvu počas fermentácie, akým je fágová infekcia.

Kmeň NMM 84/16 bol získaný z kmeňa *Streptomyces aureofaciens* CCM 3820 radom opakovaných mutagénnych zásahov (metylnitrózo-močovina, N-nitrózo-metylmočovina, UV-svetlo + N-nitrózo-metylmočovina, pôsobenie fága B1) a následných pravidelne zaraďovaných pasívnych selekcií.

Izoláty boli hodnotené podľa nasledovnej schémy:



Produkčne boli izoláty hodnotené vo dvoch pokusoch pred lyofilizáciou a v troch pokusoch po lyofilizácii. Lyofilizované konzervy slúžia k dlhodobému uchovávaní spórového materiálu a umožňujú zachovanie vhodných rastových a produkčných vlastností. Stanovenie produkčnej schopnosti izolátov bolo robené fosforečnanovou metódou a merané na prístroji Shimadzu. Týmto hodnotiacim systémom bol získaný kmeň, na ktorý je uplatňovaný patentový nárok.

Kmeň *Streptomyces aureofaciens* CCM 3948 tvorí pri monospórovom rozseve na sporulačnej pôde typu sacharóza-peptón kolónie o veľkosti 2 až 5 mm v priebehu 12 až 14 dní kultivácie pri 28 °C. Kolónie sú na okraji radiálne zvrásnené, stred kolónií je preliačený. Kultúra dobre sporuluje na sporulačnej pôde i na prírodnom substráte (proso).

Pri mikroskopickom pozorovaní mycélium je vytvorené z tenkých bohato vetvených vlákien.

V porovnaní s kmeňom CCM 3820 u kmeňa CCM 3948 je pozorovaná väčšia rastová rýchlosť. Farba vysporulovanej kultúry je šedá. Porovnanie vlastností kmeňa CCM 3948 s vlastnosťami produkčného kmeňa CCM 3820 je uvedené v nasledujúcej tabuľke:

Kmeň	Produkcia chlór-tetracyklínu v banke		Dôkaz fága v kultúre (% z počtu kultúr)
	($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	(%)	
CCM 3820	5 400	100	2
CCM 3948 (NMM 84/16)	6 230	115,4	0

Výhoda používania kmeňa *Streptomyces aureofaciens* CCM 3948 je vo vytvorení podmienok ďalšieho rastu výroby chlór-tetracyklínu bez jej ohrozenia fágovou infekciou.

Produkcia chlór-tetracyklínu kmeňom podľa vynálezu sa zvýšila v priemere o 8 až 10 %.

Nasledujúce príklady prevedenia kmeňa podľa vynálezu presne dokladajú, ale neobmedzujú.

P r í k l a d 1

Vegetatívne inokulum bolo pripravované submerzne v 500 ml varných bankách so 60 ml inokulačnej pôdy, ktorá obsahovala základné živiny, t. j. zdroj uhlíka (sacharóza), dusíka (kukuričný výluh v kombinácii s anorganickým zdrojom dusíka) a uhličitan vápenatý. Vegetatívne inokulum bolo očkované kľučkou spór zo šikmého agaru a kultivované na rotačnom trepacom stroji 21 hod. Takto pripraveným vegetatívnym inokulom boli očkované fermentačné banky o obsahu 500 ml so 60 ml fermentačnej pôdy. Zdrojom uhlíka bola sacharóza, zdrojmi dusíka kukuričný výluh, sójová múka a amónna soľ. Pôda ďalej obsahovala uhličitan vápenatý, benzyl-tiokyanát a minerálne soli. Príprava vegetatívneho inokula a fermentácia boli prevádzané na rotačnom trepacom stroji pri 240 ot./min.⁻¹, výstrednosti 2,5 cm a kultivačnej teploty 28 °C. Fermentácia trvala 96 hod., kedy bola dosiahnutá najvyššia produkcia antibiotika a boli odoberané vzorky na stanovenie.

Produkčné hodnotenie izolátov bolo opakované dvakrát, najlepšie izoláty boli lyofilizované a po vyočkovaní opäť minimálne trikrát produkčne hodnotené.

Vyššie uvedeným fermentačným spôsobom sa dosiahli produkcie chlór-tetracyklínu 5 900 až 6 200 µg.ml⁻¹ pôdy.

P r í k l a d 2

Podľa spôsobu uvedeného v príklade 1 s tým rozdielom, že príprava vegetatívneho inokula a fermentácia prebiehali v štvrtprevádzkových objemoch. Vegetatívne inokulum bolo pripravené v inokulačnom laboratórnom tanku o objeme 20 l, naplnenom 10 l inokulačnej pôdy, ktorý bol naočkovaný 100 ml spórovej suspenzie z prosnej konzervy.

Živná pôda vo fermentačných laboratórnych tankoch bola naočkováaná vegetatívnym inokulom v množstve 10 % objemu. Fermentácia prebiehala pri 28 až 29 °C, miešanie 450 ot./min.⁻¹ po dobu 90 až 92 hod.

Vzorky boli odobrané od 44. hod. kultivácie na stanovenie sacharózy anorganického dusíka a produkčnej aktivity, ktorá dosahovala v 92. hod. indexu produkcie 108 až 110 %.

P r í k l a d 3

Podľa spôsobu uvedeného v príklade 1 s rozdielom, že príprava vegetatívneho inokula a fermentácia sa realizujú vo veľkoobjemovej aparátúre. Inokulum bolo pripravené v očkovačom fermentačnom tanku o objeme 5 m³, naplnenom 3 m³ inokulačnej pôdy. Vegetatívnym inokulom bola očkovaná produkčná živná pôda vo fermentore o objeme 50 m³, ktorý bol plnený 29 m³ produkčnej živnej pôdy. Benzyltiokyanát sa dávkoval v množstve 1,5 až 3 µg.ml⁻¹ pôdy spolu s prikrmovacím roztokom, ktorého dávkovanie začínalo pri spotrebovaní zdroja uhlíka na hladinu 26 až 25 mg.ml⁻¹ pôdy. Vyššie uvedeným postupom sa dosahuje produkcia chlór-tetracyklínu zo šarže odpovedajúce indexu 108 až 110 %.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Kmeň mikroorganizmu *Streptomyces aureofaciens* CCM 3948 so zvýšenou produkciou chlór-tetracyklínu a odolný voči fágovej infekcii, najmä voči aktinofágu B1.