



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

245182

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 1/14

/22/ Prihlášené 29 09 84
/21/ PV 7388-84

(40) Zverejnené 16 12 85

(45) Vydané 15 10 87

(75)
Autor vynálezu

BUČKO MICHAL ing. CSc., HOFBAUER HENRICH ing., BANSKÁ BYSTRICA,
KŘIŠTAN VLADIMÍR ing., KOUŘIM, MIKLÁŠ EMIL ing., BANSKÁ BYSTRICA,
ŠEVČÍK BOHUMIL prof. MVDr. DrSc., POHOŘÍ, BOROŠOVÁ GABRIELA ing.,
HANO ALEXANDER, KOSTIVIAŘOVÁ ELENA ing., BANSKÁ BYSTRICA,
MARŠÁLEK JAROSLAV RNDr., KOUŘIM, REVALLOVÁ VIERA ing., BANSKÁ BYSTRICA

(54) Kmeň mikroorganizmu *Streptomyces fradiae* CCM 3765

Kmeň mikroorganizmu *Streptomyces fradiae* CCM 3765 produkující tylozín. Kmeň podľa vynálezu bol získaný pôsobením mutagénov a opakovanými pasívnymi selekciami. Výhodou kmeňa podľa vynálezu je zvýšená produkcia tylozínu /80 až 120 %/ a odolnosť k mechanickému namáhaniu, ktorému je kultúra podrobená počas miešania vo fermentore.

Vynález sa týka kmeňa mikroorganizmu *Streptomyces fradiae* CCM 3765 /interné označenie NMU 2/32/ produkujúceho tylozín.

Zvýšenie priemyselnej výroby tylozínu je možné dosiahnuť zvýšením výrobnnej kapacity, alebo zvyšovaním produkcie pri jeho biosyntéze. Druhý spôsob, t.j. zvyšovanie produkcie pri jeho biosyntéze nevyžaduje na rozdiel od prvého, veľké investičné náklady. Je založená na lepšej produkčnej schopnosti kmeňa používaného pre biosyntézu alebo na lepších fermentačných podmienkach, ktoré sa zabezpečujú dokonalejším riadením fermentácie.

Tento druhý spôsob je v súčasnej dobe jedinou možnou cestou zvýšenia výťažnosti a jedným z hlavných prínosov je zlepšovanie produkčných vlastností kmeňa. Produkčné kmene sú získavané radom zavedených postupov dlhodobých šľachtiteľských programov.

Výsledné kmene vykazujú potom rad význaných odlišných vlastností, z ktorých najdôležitejšie sú tie vlastnosti, ktoré sa prejavujú vo zvýšenej produkcii tylozínu vo fermentoroch vo výrobe.

Kmeň *Streptomyces fradiae* CCM 3765 bol získaný pôsobením mutagénov a opakovanými pasívnymi selekciami na východzí kmeň *Streptomyces fradiae* EMS 98. Spôsob šľachtenia kmeňa je znázornený na nasledujúcej schéme, kde je uvedená genealogická línia vedúca ku kmeňu, na ktorý je uplatňovaný patentový návrh.

Streptomyces fradiae EMS 98

PS

115 - 10

UV - 1

UV 1/31

PS

131 - 7

NMU - 1

NMU - 1/19

NMU - 2

NMU - 2/32

Skratky: PS - pasívna selekcia - selekcia bez pôsobenia mutagénu

UV - pôsobenie UV svetla

MNU - pôsobenie nitrozometyl močoviny

Posledné mutagénne pôsobenie bolo na kmeň inertného označenia MNU 1/19 nitrozometylmočovinou v koncentrácii 0,15 M po dobu 100 min. fosfátovom pufre s hodnotou pH 6,8 na spórovú suspenziu kmeňa MNU 1/19, získanú zmytím vysporulovanej kultúry vodou. Po dobu pôsobenia bola mutačná zmes miešaná na elektromagnetickom miešadle pri 25 °V.

V časových intervaloch po 40, 60, 80 a 100 min. pôsobenia nitrozometylmočoviny boli odoberané vzorky a riedené riediacou radou s koeficientom 10 za súčasného zriedovania nitrozometylmočoviny na neúčinnú koncentráciu. Zriedené vzorky boli naočkované na Petriho misky so sporulačným agarom tak, aby nedochádzalo ku vzájomnému kontaktu kolónií a po vysporulovaní boli samostatné kolónie preočkované na šikmé agary.

Spóry pre pasívnu selekciu boli suspendované v destilovanej vode, riedené riediacou radou s faktorom 10 a očkované na Petriho misky so sporulačnou pôdou. Po 14-dennej inkubácii pri teplote 28 °C boli izoláty vysporulované a bolo možné ich preočkovať na šikmé agary.

Inkubácia tohto základného sporulačného materiálu prebiehala pri 28 °C 10 až 12 dní. Vyššie uvedeným spôsobom aplikáciou mutagénov a pasívnej selekcie bol získaný izolát NMU 2/32. Izoláty boli hodnotené podľa schémy šikmý agar - vegetatívne inokulum - vlastná fermentácia.

Kmeň mikroorganizmus *Streptomyces fradiae* CCM 3765 prevyšuje produkciu dosiaľ používaných kmeňov o 80 až 120 %. Kmeň tvorí pri kultivácii na sporulačnej pôde s kvasničným extraktom, hovädzím extraktom, hydrolytovaným kaseinom a dextrínom kolónie o priemere 4 až 6 mm vyvýšené nad substrátom so sporulovaným stredom, s bielymi spórmi v strede po 10 až 12-dňovej kultivácii pri 28 °C.

Prednosťou tohto kmeňa je jeho odolnosť k mechanickému namáhaniu, ktorému je kultúra podrobená počas miešania vo fermentore. Hlavnou a najvýznamnejšou vlastnosťou kmeňa *Streptomyces fradiae* CCM 3765 je zvýšená produkcia tylozínu pri submerznej fermentácii.

P r í k l a d 1

Fermentácia v bankách na rotačných trepačkách

Vegetatívne inokulum bolo pripravené submerzne v 500 ml varných bankách so 60 ml inkulačnej pôdy /kukuričný extrakt, sójová múka, sójový olej a CaCO_3 /. Živná pôda po vysterylizovaní bola naočkovaná kľučkou spór zo šikmého agaru a inkubovaná na rotačnom trepacom stroji 40 až 48 hodín.

Takto pripraveným vegetatívnym inokulom boli očkované produkčné varné banky o obsahu 500 ml s objemom fermentačnej pôdy 60 ml /zdroj uhlíka repná melasa, sójový olej, zdroj dusíka rybia múka, kukuričný gluten, anorganické soli a CaCO_3 /. Fermentácia prebieha 8 až 9 dní kultivácie. Produkcia tylozínu za vyššie uvedených podmienok dosiahla 6 000 mj./ml.

P r í k l a d 2

Fermentácia v poloprevádzkovom fermentore

Fermentácia v poloprevádzkovom fermentore o objeme 5 000 l bola dvojstupňová. Očkovacia pôda obsahovala kukuričný extrakt, sójovú múku, krmné droždie, sójový olej a CaCO_3 . Fermentačná pôda obsahovala kukuričný extrakt, rybiu múku, kukuričný gluten, repnú melasu, sójový olej a CaCO_3 .

Fermentor bol plnený 2 800 l pôdy a očkovaný 10 % objemu z očkovacieho fermentoru. Kultivácia prebiehala pri teplote 28 °C, miešanie 180 obr./min., vzdušenie 2 500 l/min. za 200 hod. kultivácie. Produkčným kmeňom *Streptomyces fradiae* CCM 3765 bola dosiahnutá produkcia 6 300 mj./ml.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Kmeň mikroorganizmu *Streptomyces fradiae* CCM 3765 produkujúci tylozín.