

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

217931

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³

C 12 P 29/00

(22) Přihlášeno 10 07 81
(21) (PV 5328-81)

(40) Zveřejněno 28 05 82

(45) Vydáno 15 12 84

(75)
Autor vynálezu

PALEČKOVÁ FRANTIŠKA dr., VONDRÁČKOVÁ JITKA dr., ČULÍK KAREL dr.,
VONDRÁČEK MILOSLAV dr., PRAHA

(54) Kmen *Streptomyces alboflavus* CCM 3505

Vynález se týká nového kmene *Streptomyces alboflavus* CCM 3505, který transformuje 5-hydroxy-anhydrotetracyklin na 6-deoxy-5-hydroxytetracyklin.

Vynález se týká kmene *Streptomyces alboflavus* CCM 3505, transformujícího 5-hydroxy-anhydrotetracyklin na 6-deoxy-5-hydroxytetracyklin (doxycyklin), při kultivaci v tekutých živných půdách obsahujících zdroje asimilovatelného uhlíku, například sacharózu nebo škrob, zdroje asimilovatelného dusíku, například kukuřičnou máčecí vodu nebo mouku kukuřičnou, bavlíníkovou či sojovou a minerální živné soli.

Zmíněný kmen umožňuje výrobu tetracyklinového antibiotika doxycyklinu biologickou cestou. Dosud běžně klinicky užívaná tetracyklinová antibiotika, tj. chlortetracyklin, tetracyklin a oxytetracyklin, mají velmi široké uplatnění, přesto však mají některé vlastnosti, které jejich použití brzdí. Jde např. o vysrážení ve formě nerozpustné báze, čímž poklesne absorpce, nežádoucí působení na střevní mikroflóru apod. Naproti tomu doxycyklin se rychle a úplně absorbuje, vytvoří při nižších dávkách vysokou koncentraci v krvi, je asi třikrát účinnější než dosud užívané tetracykliny.

6-Deoxytetracykliny se dosud vyrábějí chemickou cestou (C. R. Stephens se sp., J. Am. Chem. Soc. 80, 5324, 1958; americký patentový spis č. 3 200 149) a to postupem, který je náročný na suroviny (drahé katalyzátory), na přístrojové vybavení a na dodržování fyzikálních parametrů.

Biologický postup má své přednosti i výhody pro svoji jednoduchost. Genetickou cestou se podařilo připravit kmen *Streptomyces alboflavus*, schopný transformovat 5-hydroxy-anhydrotetracyklin na 6-deoxy-5-hydroxytetracyklin. Anhydrotetracykliny lze snadno získat z tetracyklinů působením silné minerální kyseliny, např. chlorovodíkové.

Ve francouzském patentovém spisu č. 2 187 301 je popsána příprava kmene transformujícího anhydrotetracykliny. Jako hlavní a podstatný znak přípravy je uvedena dokonalá dehydratace kultury. Postup vedoucí k získání nového kmene podle vynálezu se liší rozdílným genetickým přístupem. Vychází ze znalosti biosyntézy tetracyklinů, zvláště pak z posledních 3 až 4 fází (P. A. Miller se sp., Bioch. Bioph. Res. Comm. 18, 325, 1965; americký patentový spis č. 3 433 709) a zaměřuje se na blokování poslední fáze, tj. biosyntézy oxytetracyklinu, přípravou variant neprodukcujících oxytetracyklin (OTC⁻). Kmeny OTC⁻ jsou z genetického hlediska dvojího typu: vzniklé buď zablokováním 5a,11a-dehydrogenázové aktivity a pak konečným produktem je 5a,11a-dehydro-5-hydroxytetracyklin nebo zablokováním hydroxylázové aktivity (týká se hydroxylace v pozici 6) a vzniká 6-deoxy-5-hydroxytetracyklin. Tudíž ne všechny OTC⁻ kmeny transformují dehydro-oxytetracyklin na 6-deoxy-5-hydroxytetracyklin, ale jen kmeny s porušenou hydroxylázovou a zachovanou 5a,11a-dehydrogenázovou aktivitou. Selekcí nebo mutagenním zásahem byly z kmenů OTC⁻ získány kmeny schopné transformace.

Kmen *Streptomyces alboflavus* CCM 3505 byl připraven genetickými zásahy zaměřenými v první fázi na izolaci kmenů OTC⁻ a ve druhé fázi pak na kmeny schopné transformace. Výchozím kmenem byl kmen *Streptomyces alboflavus* ATCC 15846. Pro všechny mutagenní pokusy byly připravovány suspenze spor smytím kultury ze šikmého sporulačního agaru sporulační půdy 10 ml sterilní destilované vody a třikrát promyty pufrem podle použitého mutagenu. Před použitím byla suspenze filtrována přes vatový filtr. Suspenze spor výchozího kmene pufru o pH 6 byla vystavena působení nitrosoetylmočoviny (NEU) v koncentraci 0,1 M po dobu 60 minut, po této době přežívalo řádově $1 \cdot 10^0$ % spor. V dalším pokusu byl kmen OTC⁻ vystaven působení N-metyl-N-nitro-N-nitrosoguanidinu v pufru o pH 8 a v koncentraci 0,01 M. Po 60 minutovém působení přežívalo řádově $1 \cdot 10^0$ % spor. Izoláty z těchto pokusů byly vybírány podle toho, zda ztratily schopnost produkovat OTC, což se zjišťovalo screening testem. Z kolonií izolátů byly očkované horní plošky válečků agarové sporulační půdy a ty kultivovány v Petriho miskách o průměru 100 mm. Misky jednoho pokusu byly uloženy ve skleněných krabicích s nádobkou naplněnou vodou, aby nevysychaly, a byly inkubovány 5 dnů při 28 °C. Poté byly přeneseny na testovací misky s kmenem *Bacillus subtilis* 6633 citlivým na OTC. Po 18 hod. kultivace byly vybírány kmeny bez inhibičních zón, tj. kmeny OTC⁻.

Ze *Streptomyces alboflavus* ATCC 15846 byl vybrán kmen OTC⁻ z pokusů NEU, který se stal mateřským kmenem kmene *Streptomyces alboflavus* CCM 3505 podle vynálezu. Z pokusů byla výše uvedeným testem zjištěna frekvence reverzí 3,3 %. Zbývající izoláty byly dále testovány screening testem podle schopnosti transformovat 5-hydroxy-anhydrotetracyklin na 6-deoxy-5-hydroxytetracyklin tak, že byly čárově očkovány na Petriho misky vždy 1 kmen na 1 misku a po 5denní kultivaci při 28 °C bylo do vzdálenosti 10 mm od kultury umístěno malé množství 5-hydroxy-anhydrotetracyklinu. Po dalších 20 hodinách působení při 28 °C byly misky hodnoceny podle barvy záření v ultrafialovém světle: 5-hydroxy-anhydrotetracyklin svítí citronově žlutě, 6-deoxy-5-hydroxytetracyklin oranžově žlutě. Tímto testem byly vyloučeny kmeny ne-transformující.

Posledním testem bylo sledování vlastní transformace kultivací na třepačce (3,83.S⁻¹, výchylka 25 mm) při 26 až 38 °C, s výhodou při 28 °C, ve dvou stupních. Vegetativní inokulum je kultivováno 30 hodin a jím v množství 3,3 % obj. očkovaná produkční fáze. Ta je kultivována za týchž podmínek jako vegetativní inokulum. Roztok 5-hydroxy-anhydrotetracyklinu ve směsi dimethylformamidu s vodou (1:1), v koncentraci 5 až 12 g/litr lze přidat na začátku kultivace, výhodnější je však přidavek v době dobře narostlé kultury. Kultivace končí kolem 120. hod. Přítomnost 6-deoxy-5-hydroxytetracyklinu se testuje papírovou chromatografií nebo chromatografií na tenké vrstvě v systému kyselina citronová - n-butanol - chloroform. Výsledky chromatografie se potvrzují autobiografií, tj. přenesením chromatogramů jednotlivých kmenů na misky s testovacím kmenem *Bacillus subtilis* 6633, tedy biologickou účinností. Kmen *Streptomyces alboflavus* CCM 3505 byl připraven působením N-metyl-N-nitro-N-nitrosoguanidinu na výše uvedený mateřský kmen.

Kmen *Streptomyces alboflavus* CCM 3505 podle vynálezu se neliší morfologicky od výchozího kmene, je však odlišný svými fyziologickými vlastnostmi, které jsou projevem genetických změn: jde o neschopnost biosyntetizovat oxytetracyklin a o schopnost transformovat 5-hydroxy-anhydrotetracyklin na 6-deoxy-5-hydroxytetracyklin.

Nový kmen *Streptomyces alboflavus* byl uložen v Československé sbírce mikroorganismů Univerzity J. E. Purkyně v Brně, Tř. Obránců míru 10, pod číslem CCM 3505.

V následujícím příkladu provedení je ilustrována kultivace nového kmene a provedení transformace 5-hydroxy-anhydrotetracyklinu na 6-deoxy-5-hydroxytetracyklin.

Příklad provedení

Kulturou kmene *Streptomyces alboflavus* CCM 3505 vyrostlou na šikmém agaru sporulační půdy XVI se kličkou spor očkuje 30 ml živné půdy ve varné baňce o objemu 500 ml.

Složení půdy XVI:

dextrin bílý	1,5 % hm.
pepton	0,5
síran hořečnatý kryst.	0,05
síran železnatý kryst.	0,001
sacharóza	0,3
močovina	0,01
masový extrakt	0,1
chlorid sodný	0,05
hydrogenfosforečnan draselný	0,05
agar	2,0

pH upravit pomocí NaOH (20% roztok) na 7,3, sterilizace 30 minut při 120 °C.

Složení půdy pro přípravu vegetativního inokula:

kukuřičná máčecí voda	1,0 % hm.
sacharóza	1,5
hydrogenfosforečnan amonný	0,2
dihydrogenfosforečnan draselný	0,2
síran hořečnatý krystalický	0,025
vodovodní voda do	100,0

pH před sterilizací 6,6, po sterilizaci (30 minut při 120 °C) asi 6,3. Kultivace na rotační třepačce ($3,83.s^{-1}$, výchylka 25 mm) při 28 °C trvá 30 hodin.

Získaným vegetativním inokulem v množství 3,3 % obj. očkuje 30 ml produkční půdy ve varných baňkách o objemu 500 ml tohoto složení:

kukuřičná máčecí voda	3,0 % hm.
sacharóza	1,25
chlorid vápenatý	0,95
hydrogenfosforečnan amonný	0,26
vodovodní voda do	100,0

pH před sterilizací 6,3, po sterilizaci (30 minut při 120 °C) asi 6,7.

Po naočkování se kultivuje na rotační třepačce ($3,83.s^{-1}$, výchylka 25 mm) při 28 °C, za 72 hodin se přidá 1,2 ml roztoku anhydroxytetracyklinu ve směsi dimetylformamid - voda (1:1) obsahujícího 250 mg anhydroxytetracyklinu v 1 ml. Po 48 hodinách se stanoví přítomnost 6-deoxy-5-hydroxytetracyklinu papírovou chromatografií a jeho biologická účinnost autobiografií.

Antibiotikum se přivede do fermentační kapaliny okyselením na pH 1. Z čirého filtrátu se izoluje z kyselého prostředí jako sůl s aromatickou sulfokyselinou nebo při neutrálním pH jako komplex se zinkem nebo vápníkem a hořčíkem. Tyto sloučeniny se pak převedou na hydrochlorid. Celkový výtěžek operace je 50 až 55 %.

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Kmen *Streptomyces alboflavus* CCM 3505, transformující 5-hydroxy-anhydrotetracyklin na 6-deoxy-5-hydroxytetracyklin.