



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 214 342

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 01 12 80
(21) PV 8331-80

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³C 12 N 1/20

(40) Zveřejněno 15 09 81
(45) Vydáno 01 06 84

(75)

Autor vynálezu ZELENÝ KAREL RNDr., PRAHA, MATELOVÁ VLASTA RNDr. CSc., ROZTOKY U PRAHY,
ČULÍK KAREL RNDr., ULBERT STANISLAV ing., PRAHA, BUČKO MICHAL ing.CSc.,
BERTAN MILAN ing., BANSKÁ BYSTRICA

(54) Kmen mikroorganismu Streptomyces aureofaciens CCM 3493

Vynález se týká nového kmene Streptomyces aureofaciens CCM 3493, který produkuje v provozních podmínkách chlortetracyklin ve vyšších výtěžcích než kmen dosavadní.

Vynález se týká kmene mikroorganismu *Streptomyces aureofaciens* CCM 3493 /NMU XXIV/53/, produkujícího chlortetracyklin. Chlortetracyklin /CTC/ se získává aerobní kultivací produkčního kmene *Streptomyces aureofaciens* v tekutých živných půdách za submersních podmínek.

Výroba CTC, která se realizuje ve výrobních fermentačních tancích již více než dvě desetiletí, dospěla postupnými změnami technologie do takového stadia, kdy další zvýšení výroby chlortetracyklinu je možné buď zásadními změnami v celé technologii výroby /přestavba fermentačních tanků, míchadel, dávkovacích zařízení atd./, které jsou velice nákladné a vyžadují uvolnění vysokých částek ze státního rozpočtu, anebo použitím nových produkčních kmenů, jejichž schopnost produkce CTC je podstatně vyšší.

Kmen mikroorganismu *Streptomyces aureofaciens* CCM-3493 NMU/XXIV/53 byl získán následnou řadou mutagenních zásahů a pasivních selekcí, především působením etylmetansulfonátu, nitrosometylmočoviny, gama/paprsků a UV-světla. Poslední mutagenní zásah bylo působení nitrosometylmočoviny /NMU/ v koncentraci 0,15 M po dobu 80 minut ve fosfátovém pufru pH 6,8 na sporovou suspensi kmene *Streptomyces aureofaciens* gama X/237, získanou smytím vysporulované kultury vodou s 0,1 % Tweenu 80. Během působení byla mutační směs míchána na elektromagnetickém míchadle při 25 °C. V časových intervalech 30, 45, 60, 80 a 100 minut působení NMU byly odebírány vzorky a ředěny ředicí řadou s koeficientem 10 za současného vyředění NMU na neúčinnou koncentraci. Naředěné vzorky byly vysety na Petriho misky se sporulačním dextrinovým agarem se sacharózou a dalšími ingrediencemi tak, aby nedocházelo ke vzájemnému kontaktu kolonií po jejich nárůstu a po vysporulování byly samostatné kolonie přeočkovány na šikmé agary. Takto získané kultury na šikmých agarech byly výchozí pro celý systém produkčního hodnocení, které se provádí podle následujícího schématu:

I. vegetativní generace → II. vegetativní generace → fermentace

Produkce CTC kmenem *Streptomyces aureofaciens* CCM 3493 /NMU XXIV/53/ byla ve srovnání s dvěma současnými kontrolními kmeny - gama X/237 a NMU XXIII/61 o 25 až 35 %, resp. o 5 až 10 % vyšší.

Kmen mikroorganismu *Streptomyces aureofaciens* CCM 3493 /NMU XXIV/53/ tvoří při kultivaci na dextrinovém agaru kolonie velikosti 10 až 10,5 mm s okrajovou nesporelující zónou 1,3 až 1,5 mm.

Vzdušné mycelium je bílé, ale při sporulaci nabývá hnědého až šedivého zabarvení. Hyfy dosahují podle stáří 0,7 až 1,5 u, spóry jsou většinou kulovité až elipsoidní o průměru asi 1,5 u.

Příklad 1

Fermentace v laboratorním měřítku na rotačních třepacích strojích:

Vegetativní inokulum:

Vegetativní inokulum se připravuje ve dvou stupních, tj. I. a II. vegetativní generace, v 500 ml varných baňkách s 80 ml inokulační půdy /sacharóza, sójová mouka, melasa řepná, kuřičný extrakt /CSL/ a směs solí/. I. vegetativní generace je očkovaná kličkou spor ze šikmého agaru a inkubována na rotačních třepacích strojích při 240 obr./min., výstřednost 25 mm

při 29 °C 24 hodin. II. vegetativní generace je očkovaná z I. vegetativní generace 5 %, podmínky kultivace jsou shodné s I. vegetativní generací.

Produkční hodnocení:

Produkční baňky se 40 ml produkční půdy /sacharóza, sójová mouka, CSL, melasa, směs soli a benzylnhodanid/ je zaočkována 10 % vegetativního inokula /II. vegetativní generace/. Fermentace je prováděna na rotačních třepacích strojích při 240 obr./min. /výšřednost 25 mm/ při 29 °C po dobu 120 hod. Vzorky na stanovení produkce CTC a vzájemného poměru produkovaného CTC a TC /tetracyklin/ jsou odebírány v 96. a 120.hodině kultivace. Množství produkovaného antibiotika je stanovováno kolorimetricky s reagenčním roztokem 2 N HCl a poměr CTC : TC je stanovován chromatograficky.

Produkční srovnání:

Kmen <i>Streptomyces aureofaciens</i>	Produkce CTC	Relativní produkce kontr. izolátu	Poměr CTC : TC
gamma X/237	4980	100	94 : 6
NMU XXIII/61	6450	129	94 : 6
NMU XXIV/53 /CCM 3493/	6670	134	94 : 6,

Příklad 2

Fermentace v laboratorních tancích objemu 2 l.

Fermentace se provádí obdobným způsobem podle bodu 1 ve fermentorech objemu 2 000 ml, plněných 750 ml půdy.

Příprava vegetativního inokula I. a II. generace izolátu NMU XXIV/53 spolu s dvěma kontrolními izoláty byla provedena stejným způsobem jako v příkladu 1. Z každého izolátu bylo připraveno inokulum II. generace ve 3 baňkách plněných à 80 ml kultury. Vlastní fermentace byla provedena v 9 dvoulitrových skleněných fermentorech. Každý fermentor byl vybaven jednou šestilopatkovou otevřenou turbinou polovičního průměru ve srovnání s průměrem tanku a vzdušnicí tryskou umístěnou pod turbinou. Fermentory byly plněny à 800 ml živné půdy o složení: 6 % sacharózy, 3, 5 % sójové mouky, 0,7 % CaCO_3 , 0,6 % corn-steepu, 0,6 % $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$, 0,24 % NaCl, 0,22 % melasy, 0,1 % KH_2PO_4 , 0,005 % MgSO_4 , 0,003 % MnSO_4 , 0,002 % ZnSO_4 , 0,0004 % $\text{Co/NO}_2/2$, 0,0002 % benzylnhodanidu. Po 40 min. sterilizace při 120 °C a vytemperování na 29 °C byly půdy očkovány 80 ml inokulační kultury II. generace. Každý izolát byl naočkován do 3 fermentorů. Fermentace probíhala při 29 °C po dobu 120 hod. za sálého míchání 760 ot./min. a vzdušnění 700 ml vzduchu/min. V průběhu fermentace bylo prováděno odpěňování sójovým olejem. Na konci fermentace byly hodnoceny produkce CTC a poměr CTC : TC. Průměrné hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce:

Produkční srovnání:

Kmen <i>Streptomyces aureofaciens</i>	Produkce CTC	% produkce kontrol. izolátu	poměr CTC : TC
gamma X/237	6300	100	93 : 7
NMU XXIII/61	7750	123	94 : 6
NMU XXIV/53	8190	130	94 : 6
/CCM 3493/			

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Kmen mikroorganismu *Streptomyces aureofaciens* CCM 3493 produkující chlortetracyklin.