



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

218032
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 1/06

(22) Přihlášeno 15 09 81
(21) (PV 6788-81)

(40) Zveřejněno 28 05 82

(45) Vydáno 15 02 85

(75)
Autor vynálezu

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

(54) Způsob přípravy monensinu nebo jeho solí, zejména faktoru A

1

2

Vynález se týká způsobu přípravy monensinu nebo jeho solí, zejména faktoru A. Výchází kmen *Streptomyces cimamonensis* 179 CCM 3504 se fermentuje při teplotě 28 °C až 40 °C v submersní kultuře ve třech stupních. 1. inokulační půda obsahuje glycerol, pepton, masový výtažek a NaCl, 2. inokulační půda glukosu, sušené pivovarské kvasinky Pangamin, sójovou mouku a uhličitán vápenatý a fermentační půda ve třetím stupni obsahuje ve hmotnostní koncentraci

rostlinný olej	2 až 10 %
glukosu	1 %
sójovou mouku	0,5 až 2 %
uhličitán vápenatý	0,5 %
hydrofosforečnan draselný	0,01 %

načež se výsledný produkt izoluje známým způsobem.

Vynález se týká přípravy monensinu, zejména faktoru A, případně přípravy antibiotického a koksidiostatického komplexu látek monensinového typu.

Způsob přípravy monensinového komplexu (antibiotika A 3823) je známý dle US patentu č. 3 501 568. Příprava je založena na fermentaci kmene *Streptomyces cinnamomensis* ATCC 15 413 za submersních aerobních podmínek v kultivačním prostředí, které obsahuje asimilovatelné zdroje uhlíku, dusíku a dále anorganické soli.

V popisu citovaného vynálezu není uvedena výtěžnost nárokováného postupu, ale v získaném komplexu převládají faktory A a B (příklad 4). Po zdlouhavé chromatografii na sloupci silikagelu (450 frakcí) lze získat 40 % faktoru A v čistém stavu, kdežto 50 % téhož komplexu se eluuje jako směs faktorů A a B.

Antibiotická účinnost faktoru A vůči *Bacillus subtilis* je více než dvojnásobně vyšší v porovnání s aktivitou faktoru B. Kokcidistatická účinnost jednotlivých faktorů není známá, ale podle předběžného testu je účinnost faktoru A vyšší i v tomto případě. Proto je výhodné fermentovat produkční kmen za podmínek, při nichž se tvoří převážně faktor A, aniž se sníží biosynthetická aktivita kmene.

Produkční kmen roste dobře na živných půdách, které obsahují asimilovatelné zdroje uhlíku a dusíku, jako jsou mono- a polysacharidy včetně jejich hydrolyzátů, melasa, amonné soli, dusičnany, aminokyseliny, močovina, různé typy bílkovinných mouček rostlinného i živočišného původu včetně jejich hydrolyzátů. Živné prostředí obsahuje také minerální soli fosforečnanů, chloridů, síranů a uhličitanů, obsahující draselné, hořečnaté, sodné a vápenaté ionty. Stopové prvky jako kobalt, měď, bór apod. jsou již většinou přítomny v živných složkách kultivačního prostředí jako nečistoty.

Dle citovaného US patentu se uvedený kmen kultivuje buď v submersní aerobní kultuře při 28 °C až 38 °C během 3 až 6 dnů nebo až 12 dnů při povrchové fermentaci.

Za těchto podmínek kmen *Streptomyces cinnamomensis* 179, uložený ve Sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně v Brně pod č. CCM 3504, produkuje monensinový komplex, v němž převládají faktory A a B. Jejich vzájemný poměr se pohybuje v rozmezí 30 až 60 % faktoru A ke 40 až 70 % faktoru B, a to jak při fermentacích v baňkách, tak i v tanku.

Předmětem vynálezu je způsob přípravy monensinu nebo jeho soli, zejména faktoru A, jehož podstatou je, že se kmen *Streptomyces cinnamomensis* 179 CCM 3504 fermentuje při teplotě 28 °C až 40 °C v submersní kultuře ve třech stupních, a to v prvním stupni na 1. inokulační půdě, která obsahuje ve hmotnostní koncentraci

glycerol	1 až 3 %
pepton	0,25 %
masový výtažek	0,2 až 0,7 %
chlorid sodný	0,1 %

ve druhém stupni na 2. inokulační půdě, která obsahuje ve hmot. koncentraci

glukosu	2 až 6 %
sušené pivovarské kvasinky Pangamin	1 %
sójovou mouku	0,5 až 2 %
uhličitan vápenatý	0,2 %

a ve třetím fermentačním stupni na půdě, která obsahuje ve hmot. koncentraci

rostlinný olej	2 až 10 %
glukosu	1 %
sójovou mouku	0,52 %
uhličitan vápenatý	0,5 %
hydrofosforečnan draselný	0,01 %

načež se výsledný produkt izoluje známým způsobem.

Přednost tohoto způsobu spočívá v tom, že složením fermentačních půd a podmínkami fermentace lze připravit monensinový komplex, v němž převládá faktor A a který obsahuje jen velmi nízký podíl faktoru B. Při fermentaci v baňkách byl zjištěn obsah faktoru B nižší než 10 % z celkového obsahu monensinového komplexu. Při fermentaci v poloprovodním tanku za stejných podmínek byl obsah faktoru B ještě nižší.

Jednotlivé faktory A a B byly identifikovány jadernou magnetickou resonancí a hmotovou spektroskopií. Získaná spektra souhlasí s publikovanými spektry.

Obsah monensinového komplexu ve fermentační půdě, v extraktech apod. se stanoví známou biologickou titrací na agarových plotnách. Jako testovací mikroorganismus se používá *Bacillus subtilis*. Při vyšším obsahu faktoru B v komplexu jsou výsledky stanovení v důsledku nižší citlivosti testovacího mikroorganismu vůči faktoru B nižší než skutečný obsah.

Jednotlivé faktory lze stanovit chromatografií na tenké vrstvě silikagelu. Pro stanovení se používají hotové silikagelové desky pro chromatografii na tenké vrstvě (Silufol — k. p. Kavalier). Chromatogramy se vyvíjejí v soustavě n-heptanoctan ethylnatý-methanol v objemových poměrech 5 : 4 : 1. Červené skvrny monensinu se objeví po postříkání chromatogramu vanilinovým činidlem (3 hmot. % vanilinu v ethanolu, který obsahuje 1,5 hmot. % kys. sírové) a následujícím zahříváním na 110 °C. Při vhodně voleném dávkování jak vzorků tak i standardů se docílí přesnosti stanovení odpovídající běžné biologické titraci antibiotik. Na rozdíl od biologického stanovení monen-

sinu nejsou nepříznivě ovlivněny výsledky obsahem faktoru B v komplexu.

Komponenty monensinového komplexu mají lipofilní charakter. Rozpouštějí se snadno v organických rozpouštědlech, ale ve vodě jen nepatrně jak ve formě volné kyseliny, tak i sodné nebo draselné soli. Antibiotický komplex monensinu lze získat extrakcí známými postupy, a to jak z filtrátu fermentační kapaliny, tak i z filtračního koláče, který je směsí mycelia a zbytku pevných podílů fermentační půdy. Před filtrací je třeba upravit pH fermentační kapaliny na hodnotu 8 až 9 roztokem sody nebo jiného vhodného neutralizačního činidla. Extrakci z filtrátu lze provést méně polárními rozpouštědly nemísitelnými s vodou (např. chloroformem, octanem ethylnatým, octanem butylnatým apod.) nebo jejich směsí s nepolárními rozpouštědly (alifatickými nebo aromatickými uhlovodíky). Aktivní komplex z filtračního koláče lze také extrahovat organickými rozpouštědly. Vhodnými rozpouštědly jsou např. ethanol, methanol, aceton, octan ethylnatý nebo butylnatý. Extrakci lze provést i chloroformem nebo jeho směsí s některými nepolárními rozpouštědly.

Při fermentaci *S. cinnamomensis* na půdě s rostlinným olejem obsahuje filtrát fermentační kapaliny zhruba polovinu vzniklého monensinového komplexu. Při extrakci přejde do organické fáze i zbytek oleje, který nebyl metabolizován. Tento olej se z extraktu odstraní po oddestilování rozpouštědla roztřepáním odparku mezi nepolární rozpouštědlo (n-hexan, petrolether apod.) a směs methanolu s roztokem chloridu sodného (10 % hmot.) v objemovém poměru 4:1. Převážná část aktivního komplexu je po roztřepání obsažena v polárnější fází (minimálně 80 % celkového obsahu). Z roztoku se získá vytřepáním do chloroformu nebo jeho směsí s tetrachlormethanem a odpařením vytřepku za sníženého tlaku. Získaný odparek obsahuje v závislosti na výši produkce při fermentaci 20 až 50 % aktivního komplexu.

Tento odparek lze buď přímo zpracovat na monensinový premix pro přípravu medikovaných krmiv k výkrmu ve velkochovech, nebo dále čistit. V tomto případě se rozpouštěný odparek nejprve odbarví aktivním uhlím a filtrát se pak dále čistí sloupcovou chromatografií na vhodné stacionární fázi. Výhodná je chromatografie na silikagelu. Jako eluční činidlo se může použít např. benzen, chloroform, octan ethylnatý a jejich směsí s acetonem nebo methanolem.

Průběh sloupcové chromatografie se sleduje výše popsanou chromatografií na tenké vrstvě. Frakce eluátu, které obsahují stejný faktor, se spojí a za sníženého tlaku odpaří. Odparky se podrobí krystalizaci.

Dále jsou uvedeny příklady způsobu přípravy monensinu dle vynálezu.

Příklad 1

Příprava monensinu kultivací v baňkách
Spory produkčního kmene *Streptomyces cinnamomensis* 179 se naočkují na šikmý živný agar následujícího složení:

kvasničný extrakt	4,0 g
sladinový extrakt	10,0 g
glukosa	4,0 g
Oxid agar	30,0 g
voda dest. do	1,0 l

Zaočkovaná půda se inkubuje při 28 °C 10 dnů. Kultura se přenesse do 1. inokulační půdy následujícího složení ve hmotnostní koncentraci

glycerol	2,0 %
pepton	0,25 %
masový výtažek	0,5 %
chlorid sodný	0,1 %

a třepe se 48 hodin při teplotě 37 °C na rotační třepačce při frekvenci 2,8 Hz. Takto získaným inokulem se očkuje 2. inokulační půda následujícího složení ve hmotnostní koncentraci

glukosa	4,0 %
sójová mouka	1,0 %
sušené pивcvarské	
kvasinky Pangamin	1,0 %
uhličitan vápenatý	0,2 %

60 ml této půdy v 500 ml varné baňce se očkuje 20 ml 1. inokula. Zaočkovaná půda se třepe 30 hodin při teplotě 37 °C na rotační třepačce při frekvenci 2,8 Hz.

Fermentační půda obsahuje ve hmotnostní koncentraci

sójový olej	2,0 %
glukosu	1,0 %
sójovou mouku	1,0 %
uhličitan vápenatý	0,5 %
hydrofosforečnan	
draselný	0,01 %

60 ml fermentační půdy se očkuje 2 ml 2. inokula. Zaočkovaná fermentační půda v 500 ml varných baňkách se kultivuje při 37 °C na rotační třepačce 196 hodin.

Po skončené fermentaci se slíje fermentační tekutina a 10 % roztokem sody se upraví reakce pH na hodnotu 8 až 9. Tato směs se filtruje na Büchnerově nálevce. 400 ml filtrátu se extrahuje 200 ml chloroformu a ještě dvakrát 150 ml chloroformu. Spojené extrakty se odpaří za sníženého tlaku a dosuší. Filtrační koláč se suspenduje ve 100 ml methanolu a susnese se míchá 1 hodinu. Pak se směs filtruje na Büchnerově nálevce a koláč se promyje malým množstvím methanolu. Koláč se znovu suspenduje v 80 ml methanolu a dále se postupuje jako

při první extrakci. Extrakce koláče se ještě dvakrát opakuje. Filtráty se spojí, za sníženého tlaku se oddestiluje rozpouštědlo a odparek se dosuší.

Odparky získané z filtrátu i koláče se rozpustí ve 200 ml methanolu, roztok se smísí se 200 ml 10% vodného roztoku chloridu sodného a směs se extrahuje 200 ml petroletheru. Extrakce se ještě třikrát opakuje. Petroletherové výtřepky se spojí a protřepou čtyřikrát se 200 ml směsi methanolu s 10% roztokem chloridu sodného v objemovém poměru 4:1. Vodně — methanolicke výtřepky se spojí a smísí s 10% roztokem NaCl, takže výsledná směs obsahuje 40 objemových % roztoku NaCl. Tato směs se extrahuje 400 ml chloroformu a pak ještě 2krát 300 ml chloroformu. Chloroformová vrstva se odpaří a dosuší za sníženého tlaku. Hnědý odparek — 1150 mg — obsahoval podle TLC 24% monensinu; z toho připadá na faktor B méně než 2,4%.

Příklad 2

Příprava monensinu ve fermentačním tanku.

2 l sterilní 1. inokulační půdy popsané v příkladu 1 se zaočkuje sporovou suspenzí ze šikmého agaru, která se získá smytím kultury 15 ml sterilní destilované vody. Zaočkováná půda se míchá v laboratorním fermentoru 48 hodin při frekvenci otáček 10 Hz, teplotě 37 °C a rychlosti vzdušnění 1 l/min. Tato kultura se použije k zaočkování 15 l 2. inokulační půdy, popsané v př. 1, v 35 l fermentačního tanku. Suspense se kultivuje 30 hodin při 37 °C, frekvenci míchání 4,66 Hz a rychlosti vzdušnění 8 l/min. Touto kulturou se zaočkuje 135 l fermentační půdy. Půda obsahuje 5% sójového oleje, v ostatních složkách je shodná s půdou popsanou v příkladu 1. Vlastní fermentace probíhá 190 hodin při teplotě 37 °C, frekvenci otáček 4,66 Hz a rychlost vzdušnění 50 l/min.

Po skončení fermentace se upraví pH fermentační tekutiny 10% roztokem sody na hodnotu 8 až 9 a pak se půda odstředí na odstředivce (Sharples). Získá se supernatant (95 l) a vlhký pevný podíl (9,9 kg). Supernatant se smísí s 31 l chloroformu a 9 l tetrachlormethanu a směs se míchá frekvencí 5 Hz při 30 °C po dobu 1 hod. Směs se vypustí do separátoru a ponechá stát až se fáze oddělí. Těžší fáze se vypustí do zásobníku a vodná fáze do odpadu. (Ve vzor-

ku vodné fáze nebyl při tenkovrstvé chromatografii (TLC) monensin prokázán). Z oddělení těžší fáze se oddestilují rozpouštědla za sníženého tlaku. Destilační zbytek (asi 2,5 l) se smíchá s 11 l petroletheru a tato směs se extrahuje 5krát 4,5 l směsi methanolu s 10% roztokem chloridu sodného v objemovém poměru 4:1. Vodně-methanolicke extrakty se spojí a promíchají s 5 l petroletheru. Vrstvy se oddělí a vodně-methanolicke se smíchá s 11 l 10% NaCl. Tato směs se dále dvakrát extrahuje 11 l směsi chloroformu s tetrachlormethanem v objemovém poměru 3:1 a potřetí 6 l stejné směsi. Z těžší fáze se oddestilují rozpouštědla při sníženém tlaku a odparek se dosuší. 111,3 g hnědého odparku obsahovaly 31% monensinu. Podle TLC je zastoupen minimálně 95% faktor A, kdežto faktor B méně než 5%.

Další část monensinu se získá extrakcí z pevného podílu po odstředění fermentační tekutiny. Ten se suspenduje ve 25 l methanolu a suspence se míchá 1 hod. Extrakt se odfiltruje a filtrační koláč se ještě dvakrát suspenduje ve stejných objemech methanolu. Filtráty se spojí a za sníženého tlaku se methanol oddestiluje. Destilační zbytek se extrahuje petroletherem (5X 1,2 l). Petroletherové vrstvy se spojí a extrahují 5X 2 l směsi methanolu a 10% roztokem NaCl v objemovém poměru 4:1. Spojené vodně-methanolicke výtřepky se promíchají se 2,5 l petroletheru. Po oddělení fází se vodně-methanolicke vrstva smíchá se 3,5 l 10% roztoku NaCl. Tato směs se pak extrahuje 2X 4 l a potřetí 2 l směsi chloroformu s tetrachlormethanem v objemovém poměru 3:1. Z extraktu se oddestilují rozpouštědla za sníženého tlaku a odparek se dosuší. Uvedeným postupem bylo získáno 119,5 g hnědého odparku, který dle TLC obsahoval 25% monensinu, z něhož více než 95% připadalo na faktor A.

Získané odparky lze použít přímo pro přípravu monensinového premixu k výrobě medikovaných krmiv pro výkrm ve velkochovech. V případě potřeby lze získat čistý faktor A. Nejprve se rozpuštěný odparek odbarví aktivním uhlím a filtrát se pak dále čistí chromatografií na sloupci silikagelu známým postupem. K eluci se použije postupně chloroform a jeho směs s methanolem. Na základě výsledků chromatografie na tenké vrstvě se spojí frakce, které obsahují žádaný faktor A a z odparku se krystalizací ze směsi n-hexan — chloroform získá čistý produkt.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy monensinu nebo jeho soli, zejména faktoru A, vyznačený tím, že se kmen *Streptomyces cinnamonensis* 179 CCM 3504 fermentuje při teplotě 28 °C až 40 °C v submersní kultuře ve třech stupních, a to v prvním stupni na 1. inokulační půdě, která obsahuje ve hmotnostní koncentraci

glycerol	1 až 3 %
pepton	0,25 %
masový výtažek	0,2 až 0,7 %
chlorid sodný	0,1 %

ve druhém stupni na 2. inokulační půdě, která obsahuje ve hmotnostní koncentraci

glukosu	2 až 6 %
---------	----------

sušené pivovarské kvasinky Pangamin	1 %
sójovou mouku	0,5 až 2 %
uhličitan vápenatý	0,2 %

a ve třetím fermentačním stupni na půdě, která obsahuje ve hmotnostní koncentraci

rostlinný olej	2 až 10 %
glukosu	1 %
sójovou mouku	0,5 až 2 %
uhličitan vápenatý	0,5 %
hydrofosforečnan	
draselný	0,01 %

načež se výsledný produkt izoluje známým způsobem.