



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

208 592

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³

C 12 N 1/201

1/20 op.

C 12 R 1/485

(22) Přihlášeno 19 10 79

(21) PV 7109-79

(40) Zveřejněno 31 10 80

(45) Vydáno 31 10 83

(75)

Autor vynálezu

ZELENÝ Karel, dr., CHUDÁČKOVÁ Gabriela, dr., CSc., Praha,
MATELOVÁ Vlasta, dr. CSc., Roztoky u Prahy,
ČULÍK Karel, dr., Praha, BUČKO Michal, Ing., CSc. a
BERTAN Milan, Ing., Banská Bystrica

(54) **Kmen mikroorganismu *Streptomyces aureofaciens***

Vynález se týká nového kmene mikroorganismu *Streptomyces aureofaciens* CCM 3406 produkujícího chlortetracyklin.

(54) Kmen mikroorganismu *Streptomyces aureofaciens*

1

Vynález se týká kmene mikroorganismu *Streptomyces aureofaciens*, produkujícího chlortetracyklin. Jak je známo, získává se toto antibiotikum aerobní kultivací vhodného produkčního kmene v tekuté živné půdě, obsahující základní potřebné složky. Průmyslová výroba chlortetracyklinu, která se realizuje již po značně dlouhou dobu, dospěla postupným pokrokem zlepšujícím všechny parametry do takového stadia, kdy další zvýšení produkce jednoduchými zásahy již není možné. Určité východisko představují zásadní změny v technologii výroby (přestavba fermentačních tanků, míchadel, dávkovacích zařízení apod.); to jsou ovšem záležitosti velice nákladné a jejich možnosti jsou omezené. Ani v obměně složení živných půd, v použití nových složek půd nebo ve vedení fermentačního procesu nelze již získat ekonomicky významné rezervy. Jednou z mála možností je nalezení, výběr nebo vyšlechtění nového produkčního kmene, který by na půdě obvyklého složení, v běžném zařízení a bez náročných zásahů do průběhu fermentace produkoval chlortetracyklin ve vyšších výtěžcích než dosud a rovněž v příznivém poměru k tetracyklinu, který vzniká současně. Vyšlechtění nového kmene, poskytujícího vysoké výtěžky, je záležitost zdoluhavá a náročná. Mnohem jednodušší a rychlejší je uplatnění jednoduchých mutagenních zásahů na vysokoprodukční kmen, který je k dispozici, s cílem pokusit se tak o získání nového kmene se žádanými vlastnostmi.

Uvedeného cíle se podařilo dosáhnout podle vynálezu novým kmenem *Streptomyces aureofaciens*, označeným NMUXXIII/61, uloženým v Čs. sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně, Brno, tř. Obránců míru 10, pod číslem CCM 3406.

Tento kmen byl získán z produkčního kmene, který byl používán po řadu let při komerční výrobě chlortetracyklinu s průměrnou výtěžností 6100 až 6300 $\mu\text{g/ml}$, pod označením *Streptomyces aureofaciens* Gamma X/237 (interní označení Výzkumného ústavu antibiotik a biotransformací v Roztokách u Prahy). Na výchozí kmen bylo působeno následnou řadou mutagenních zásahů a pasivních selekcí, především ethylmethansulfonátem, nitrosomethylmočovinou, paprsky gama a ultrafialovým světlem. Posledním mutagenním zásahem bylo působení nitrosomethylmočoviny v koncentraci 0,15 M po dobu 100 minut ve fosfátovém pufru s hodnotou pH 6,8 na sporovou suspenzi kmene Gamma X/237, získanou smytím vysporulované kultury vodou s 0,1 % neontogenního smáčedla. Během působení byla mutační směs míchána na elektromagnetickém míchadle při 25 °C. V časových intervalech po 30, 45, 60 a 100 minutách pů-

2

sobení nitrosomethylmočoviny byly odebírány vzorky a ředěny ředící řadou s koeficientem 10 za současného zředování nitrosomethylmočoviny na neúčinnou koncentraci. Zředěné vzorky byly vysety na Petriho misky se sporulačním dextrinovým agarem se sacharózou tak, aby nedocházelo ke vzájemnému kontaktu kolonií, a po vysporulování byly samostatné kolonie přeočkovány na šikmé agary. Kultury získané na šikmých agarech představovaly výchozí materiál pro celý proces produkčního hodnocení, prováděný podle následujícího schématu:

I. vegetativní generace → II. vegetativní generace → fermentace.

Kmen mikroorganismu *Streptomyces aureofaciens* CCM 3406 převyšuje produkci v současnosti používaných kmenů, včetně kmenů produkčních, například *S. aureofaciens* Gamma X/237, průměrně o 20 až 30 %, při zachování všech vhodných technologických vlastností, i příznivého poměru vznikajícího chlortetracyklinu k tetracyklinu (CTC:TC).

Kmen mikroorganismu *S. aureofaciens* CCM 3406 tvoří při kultivaci na dextrinovém agaru kolonie velikosti 10,5 mm, s okrajovou nesporelující zónou 1,5 mm.

Vzdušné mycelium je bílé, ale při sporulaci nabývá hnědého až šedivého zbarvení. Hyfy dosahují podle stáří velikosti 0,7 až 1,5 μm , spóry jsou většinou kulovité až elipsovité o průměru $1,97 \pm 0,40 \mu\text{m}$.

Podrobnosti o produkčním hodnocení kmene CCM 3406 vyplývají z následujících příkladů provedení.

Příklad 1

Fermentace v laboratorním měřítku

A. Vegetativní inokulum

Vegetativní inokulum se připravuje ve dvou stupních, tj. I. a II. vegetativní generace. Do 500 ml varných baněk se umístí po 80 ml inokulační půdy (s obsahem sacharózy, sojové a arašidové mouky, řepné melasy, kukuřičného výluhu a živných solí), která se naočkuje kličkou spór ze šikmého agaru a inkubuje na rotační třepačce při 240 obr./min., s výstředností 25 mm, po dobu 24 hodin při teplotě 29 °C. II. vegetativní generace se zaočkuje 5 % I. vegetativní generace, podmínky kultivace jsou shodné s I. vegetativní generací.

B. Produkční hodnocení

Produkční baňky se 40 ml produkční půdy (s obsahem sacharózy, sojové a arašidové mouky, kukuřičného výluhu, melasy, živ-

ných solí a benzylnhodanidu) byly zaočkovány 10 % vegetativního inokula II. vegetativní generace. Fermentace probíhala na rotačních třepáčkách při 240 obr./min. (výšednost 25 mm) při 29 °C po dobu 120 h. Vzorky pro stanovení produkce chlortetracyklinu a jeho poměru k tetracyklinu byly odebrány v 96. a 120. hodině kultivace. Množství produkovaného antibiotika bylo stanovováno kolorimetricky s reagenčním roztokem 2N kyseliny chlorovodíkové a poměr antibiotik byl stanovován chromatograficky.

Produkční srovnání:

Kmen	Produkce CTC μg/ml	%	Poměr CTC:TC
S. aureofaciens Gamma X/237	4980	100	94:6
S. aureofaciens CCM 3406	6450	128	94:6

Příklad 2

Fermentace v laboratorních tancích objemu 2 litry

Fermentace byla prováděna obdobně jako v příkladu 1 v tancích objemu 2 litry, plněných po 750 ml půdy.

Produkční srovnání:

Kmen	Produkce CTC μg/ml	%	Poměr CTC:TC
S. aureofaciens Gamma X/237	6300	100	93:7
S. aureofaciens CCM 3406	7750	123	94:6

Příklad 3

Fermentace v tancích objemu 20 litrů

Fermentace byla prováděna obdobně jako v příkladu 1 v tancích objemu 20 litrů, plněných po 10 litrech produkční půdy.

Produkční srovnání:

Kmen	Produkce CTC μg/ml	%	Poměr CTC:TC
S. aureofaciens Gamma X/237	6100	100	94:6
CCM 3406	7500	124	94:6
S. aureofaciens			

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Kmen mikroorganismu *Streptomyces aureofaciens* CCM 3406 produkující chlortetracyklin.