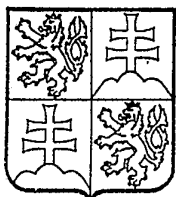


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

272 657

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl⁵
C 12 N 9/14

(21) PV 2922-87.N

(22) Přihlášeno 24 04 87

(40) Zveřejněno 13 06 90

(45) Vydáno 25 11 91

(75) Autor vynálezu

VANĚK ZDENKO RNDr., PhMr., DrSc.,
KRUMPHANZL VLADIMÍR prof. ing., DrSc. člen korespondent ČSAV,
MATĚJKA JIŘÍ RNDr., CSc.,
NOHÝNEK MIROSLAV ing., PRAHA,
MARŠÁLKOVÁ JANA RNDr.,
MARŠÁLEK JAROSLAV RNDr.,
KŘÍŠŤAN VLADIMÍR ing., CSc., KOUŘIM,
ŠEVČÍK BOHUMIL prof. MVDr., DrSc., POHOŘÍ-CHOTOUŇ

(54)

Vysokoprodukční kmen mikroorganismu *Streptomyces cin-*
namonensis produkující monensin A

(57)

K výrobě monensinu A a B se používá mikroorganismu *Streptomyces cinna-*
monensis. Nová vysokoprodukční mutanta tohoto kmene označená SMU 21, jejíž vzorek kultury je uložen pod číslem CCM 3977, produkuje monensin A v koncentraci více než 6000 µg/ml oproti výchozímu kmeni, který produkoval monensin A v koncentraci kolem 1000 µg/ml. Od rodičovského kmene *Streptomyces cinna-*
nensis ACB-NLR-2 se liší dále v těchto zna-

- a) zbarvení vzdušného mycelia při kultivaci na pevném agarovém médiu
- b) zbarvení submersních kultur
- c) využitím fruktosy pro růst při povrchové kultivaci na pevném médiu.

Jako zdroj uhlíku se při fermentaci používá směs tuků. Mutagenní zásah účinkem 8-methoxypsoralenu a UV záření.

Vynález se týká vysokoprodukčního kmene mikroorganismu *Streptomyces cinnamomensis* produkujícího monensin A, přičemž jako zdroj uhlíku se využívá tuků.

Standardní kmeny mikroorganismu *Streptomyces cinnamomensis* produkují směs monensinů, v níž jsou hlavními složkami monensiny A a B. Poměr produkovaných monensinů lze u těchto pigmentujících nízkoprodukčních kmenů omezeně regulovat použitím rostlinných olejů jako zdrojů uhlíku (AO č.218032). Nepigmentující mutantní kmen *Streptomyces cinnamomensis* K1-1 (AO č.226964) produkuje zhruba 90 % monensinu A po přidání specifických prekursorů této látky, tj. valinu nebo butyrátu (AO č.225938).

Podstatou vynálezu je nový vysokoprodukční kmen *Streptomyces cinnamomensis* SMU-21, produkující monensin A, využívající při fermentaci jako zdroj uhlíku směs tuků, který je uložen ve Sbírce mikroorganismů Univerzity J.E.Purkyně (CCM) v Brně pod číslem CCM 3977.

Novost kmene spočívá v tom, že na rozdíl od rodičovského nízkoprodukčního kmene, produkujícího monensin A na půdách obsahujících glukosu, popř. některé další cukry, produkuje nový kmen SMU-21 více než 6000 $\mu\text{g/mL}$ monensinu A při submersních kultivacích v médiích obsahujících jako zdroj uhlíku směs tuků.

Mutantní kmen *Streptomyces cinnamomensis* SMU-21 byl získán z dvojnásobně rezistentního mutantu *Streptomyces cinnamomensis* ACM-NLR-2, rezistentního k 2-amino-3-chlorbutyrátu a norleucinu, který je uložen ve Sbírce mikroorganismů Mikrobiologického ústavu ČSAV, Praha, několikastupňovou selekční metodou zahrnující působení chemických mutantů 8-methoxypsoralenu a N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidinu na sporovou suspensi a ozáření sporové suspense UV-světlem.

K suspensi spor (koncentrace konidií $1.5 \cdot 10^{11} \text{ mL}^{-1}$) v 0,1 M fosfátového pufru (Na) pH 7.0 byl přidán ethanolický roztok (96 % ethanol) 8-methoxypsoralenu tak, aby konečná koncentrace této látky byla $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Suspense byla nepřetržitě míchána na elektromagnetickém míchadle při 24°C . Po 15 min. byla suspense exponována za míchání 20 min. UV-zářením (zdrojem záření byla lampa Philips 57415 P/40 TUV 15 W), odpovídajícím toku energie 6 mJ mm^{-2} . Procento konidií přežívajících po mutagenním zásahu ($2 \cdot 10^{-7} \%$) bylo určeno z počtu kolonií vyrostlých z konidií po odstranění mutagenu po 5 dnech kultivace na agarové medium o složení (%):

kvasniční extrakt	0,4
agar se sladidlovým extraktem	2,0
glukosa	0,4
agar Oxoid	3,0
voda	

Sporová suspense (koncentrace konidií $5 \cdot 10^{11} \text{ mL}^{-1}$, v 0,05 M Tris-maleinanovém pufru (Na) pH 9.0 byla za nepřetržitého míchání na elektromagnetickém míchadle vystavena působení N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidinu v konečné koncentraci 3 mg mL^{-1} . Expoziční doba byla 120 min. při 24°C . Procento přežívajících konidií ($4 \cdot 10^{-8} \%$) po mutagenním zásahu bylo určeno stejným způsobem jako po účinku 8-methoxypsoralenu a UV-záření. Variabilita kmenů získaných po působení chemických mutagenů byla snížena přirozenou selekcí. Izolovaný mutant byl rodičovským kmenem v následujícím selekčním stupni. Kritériem pro výběr mutantů byla biologická aktivita submersních kultur, u vybraných kmenů s vysokou produkcí poměr produkovaných monensinů A a B, nepřítomnost nežádoucích derivátů fenazinu a schopnost využívat tuky. Mutant *Streptomyces cinnamomensis* SMU-21 byl po přečištění porovnán s výchozí rodičovskou kulturou *Streptomyces cinnamomensis* ACB-NLR-2.

Morfologická charakteristika

Při kultivaci na půdě se sladovým a kvasinkovým extraktem rostl mutant SMU 21 ve formě běžovo-bílých, vrásčitých kolonií s vystouplým středem. Kolonie byly pravidelné, kulaté, po 5 dnech kultivace dosahovaly velikosti 4 až 8 mm. Narostlé vzdušné mycelium s rovnými a zvlněnými sporofory se po 6 dnech kultivace členilo na jednotlivá běžovo-bílá konidia (spory)

s hladkým povrchem.

Zatímco výchozí kmen ACM-NLR-2 tvořil během submersní kultivace dlouhá větvená vlákna, na mycelitu mutanta docházelo po 40 h. kultivace k bodovému ztluštění vláken a po 50 h. nastal výrazný rozpad mycelia na útvary podobné sporám.

Zbarvení kultur při kultivacích

Při povrchových kultivacích bylo sledováno zbarvení vzdušného mycelia a zbarvení pigmentů difundujících do agarového média. Na rozdíl od výchozího rodičovského kmene ACB-NLR-2, který vylučoval žlutobílé pigmenty, bylo mutantem SMU-21 po 7 dnech kultivace médium zbarveno hnědočerveným pigmentem. Vzdušné mycelium a spóry byly u obou kmenů běžovo-bílé.

Při submersních kultivacích mělo médium po 144 hod. intenzivní tmavě hnědou barvu na rozdíl od výchozího kmene, kde byly tvořeny světle hnědé pigmenty.

Asimilace zdrojů uhlíku výchozím kmenem ACB-NLR-2 a mutantem SMU 21

Schopnost využívat různé zdroje uhlíku při povrchové kultivaci na pevných médiích byla testována podle Pridham a Gottlieb (J.Bact. 58: 107, 1948) a Shirling a Gottlieb (Int.J. Syst.Bacteriol. 16: 313, 1966). Pro srovnání je dále uvedena tabulka využití různých zdrojů uhlíku při povrchové kultivaci výchozím kmenem ACB-NLR-2 a kmenem SMU 21 podle vynálezu. Oba kmeny rostly stejně na glukose, arabinose, xylose, mannitolu a rhamnose. Na rozdíl od výchozího kmene, na fruktose rostl mutant SMU 21 mnohem lépe. Naopak výchozí kmen rostl lépe na inositolu. Růst nebyl pozorován (kromě kontroly) na sacharose, raffinose a celulóse.

Využití různých zdrojů uhlíku kmeny ACB-NLR-2 a SMU 21

zdroj uhlíku	ACB-NLR-2	SMU 21
0	-	-
D-glukosa	++	++
L-arabinosa	++	++
sacharosa	-	-
D-xylosa	+	+
i-inositol	++	+
D-mannitol	++	++
D-fruktosa	+	+++
L-rhamnosa	+	+
ruffinosa	-	-
cellulosa	-	-
- neroste	++ dobrý růst	
+ slabý růst	+++ velmi dobrý růst	

Submersní kultivace

Bylo kultivováno na rotačních třepacích strojích s frekvencí 4,5 Hz a poloměrem rotace 15 mm při 34° C v 500 ml varných baňkách s plochým dnem, plněných 50 ml, při kultivaci inkula mutantních kmenů 100 ml média.

Výchozí rodičovský kmen ACB-NLR-2 byl kultivován v médiu obsahujícím (%):

glukosa	2,5 (inokulum)
	5,0 (II.vegetativní generace)
K ₂ HPO ₄	0,05
MgSO ₄	0,05
KNO ₃	0,1
NaCl	0,05
FeSO ₄	0,001

Mutantní kmeny byly kultivovány v inokulačním médiu o složení (%):

sojová mouka	1,5
kvasničný extrakt	0,25
glukosa	0,5
dextrin	2,0
CaCO ₃	0,1

Produkční médium obsahovalo (%):

sojová mouka	3,3
glukosa	3,7
NaCl	0,033
FeSO ₄	0,011
CaCO ₃	0,25
Na ₂ SO ₄	0,22
Al ₂ (SO ₄) ₃	0,07
K ₂ HPO ₄	0,0075
kyselina askorbová	0,0019
sojový olej	2,5
námellový olej	0,5
methyloleát	0,8
NaNO ₃	0,8

Inokulační baňky I. vegetativní generace byly očkovány jednou kličkou spor z kultur na sporulační půdě, starých 7 až 10 dní. Vlastní submersní kultivace probíhala ve II. vegetativní generaci; baňky byly očkovány 4 % inokula ve stáří 18 až 14 hod. Kultivace byly ukončeny po 8 dnech.

Po skončení kultivace byla v methanolicském extraktu ze submersních kultur sledována antibiotická aktivita difusní plotnovou metodou a tvorba látek fenazinového typu autotbio-graficky po tenkovrstevné chromatografii. Testovacím organismem byl Bacillus subtilis.

Poměr produkovaných monensinů A a B byl zjišťován v hexan-chloroformovém extraktu z kultur. Po tenkovrstevné chromatografii byly zóny monensinů detegovány vanilinovým činidlem a měřena densitometricky jejich intenzita.

Spotřeba tuků byla určena v supernatantu po centrifugaci submersních kultur měřením čísla zmýdelnění.

Z charakteristik uvedených výše vyplývá, že kmen SMU 21 podle vynálezu získaný několika-
kástupňovou selekcí za použití chemických mutagenů 8-methoxypsoralenu a N-methyl-N'-nitro-
-N-nitrosoquanidinu a UV-záření se od rodičovského kmene *Streptomyces cinnamomensis* ACB-NLR-
-2 liší v těchto znacích:

- a) zbarvení vzdušného mycelia při kultivaci na pevném agarovém médiu
- b) zbarvení submersních kultur
- c) využitím fruktosy pro růst při povrchové kultivaci na pevném médiu
- d) schopností využívat jako zdroj uhlíku při kultivacích tuky
- e) vysokou produkcí monensinu A. (Oproti výchozímu kmenu produkujícímu monensin A v koncentracích kolem 1000 µg/ml, produkuje kmen SMZ 21 podle vynálezu více než 6000 µg/ml.)

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Vysokoprodukční kmen mikroorganismu *Streptomyces cinnamomensis* produkující monensin A označený jako SMU 21, využívající při fermentaci jako zdroj uhlíku směs tuků, jehož vzorek kultury je uložen ve Sbírce mikroorganismů Univerzity J.E.Purkyně (CCM) pod číslem CCM 3977.