



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

225 938

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 15 09 81
(21) PV 6787-81

(51) Int. Cl.³

C 12 P 1/06

(40) Zveřejněno 29 07 83
(45) Vydáno 01 07 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., KOUŘIM, BEDRNÍK PETR RNDr. CSc., PRAHA, KRÁLOVCOVÁ EMANUELA ing., PRAHA, STAJNER KAREL PhMr., PRAHA, TAX JIŘÍ RNDr., PRAHA, POSPÍŠIL STANISLAV ing., PRAHA, KLÁNOVÁ KATEŘINA RNDr., PRAHA

(54) Způsob přípravy monensinu A

1

Vynález se týká způsobu přípravy monensinu A fermentací kmene *Streptomyces cinnamonensis* sp. 179.

Při výrobě monensinu (kokcidiostatického antibiotika A3823) podle US patentu č. 3 501 568 fermentací kmene *Streptomyces cinnamonensis* ATCC 15413 vzniká komplex 4 monensinových antibiotik A, B, C, D, které se liší svojí biologickou aktivitou.

Způsobem monensinu podle vynálezu bylo změnami ve složení fermentační půdy dosaženo regulace tvorby jednotlivých složek komplexu tak, že vzniká v převážné míře pouze monensin A.

Předmětem vynálezu je tedy způsob přípravy monensinu A, jehož podstatou je, že se kultivuje mutantní kmen *Streptomyces cinnamonensis* 179, uložený ve Sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně v Brně pod č. CCM 3504, v submersní kultuře při 25 °C až 42 °C 3 až 6 dní v kapalném živném prostředí, které obsahuje v hmotnostní koncentraci

glukosu	1 až 6 %
sojovou mouku	1 až 2 %
síran železitý	0,02 až 0,2 %
uhličitan vápenatý	0,3 %
chlorid sodný	0,3 %

valín	0,1 až 1,5 % nebo
butyrát sodný	0,05 až 0,2 %

načež se výsledný produkt izoluje známým způsobem.

Výhoda tohoto postupu ve srovnání se způsobem přípravy monensinu A na půdě se sojovým olejem spočívá v kratší době fermentace (140 h proti 270 h) a jednodušší izolací konečného produktu (půdy neobsahují olej).

Dále jsou uvedeny příklady způsobu přípravy podle vynálezu.

Příklad 1

Příprava monensinu A submersní fermentací na živné půdě s valínem.

Spory mutantního produkčního kmene *Streptomyces cinnamonensis* 179 se naočkují na šikmý živný agar následujícího složení v hmotnostní koncentraci

kvasičný extrakt	0,4 %
sladinový extrakt	1,0 %
glukosa	0,4 %
oxid agar	3,0 %
voda dest.	do 1 l
pH	7,3

Zaočkovaná půda se kultivuje při 28 °C 10 dní. Spory se smyjí 10 ml sterilní dest. vody a 1 ml získané suspenze se očkuje 50 ml inokulační půdy v 500 ml varných baňkách.

Inokulační půda má následující složení v hmotnostní koncentraci

sojová mouka	1,5 %
glukosa	2,5 %
CaCO ₃	0,3 %
NaCl	0,3 %
Fe ₂ (SO ₄) ₃	0,03 %
voda	do 1 l
pH	6,4

Půda před očkováním se sterilizuje při 120 °C a tlaku 100 kPa po dobu 35 min. Zaočkované inokulační baňky se kultivují 20 až 24 hodin při 38 °C na rotační třepačce o frekvenci 168 kyvů za min.

Produkční baňky se očkují 2 % obj. inokula. Produkční půda má následující složení v hmotnostní koncentraci

sojová mouka	1,5 %
glukosa	5,0 %
valín	1,0 %
CaCO ₃	0,3 %

NaCl	0,3 %
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	0,03 %
pH	6,4

Naočkovaná produkční půda v 500 ml varných baňkách se kultivuje při 38 °C, 120 hodin na výše popsané rotační třepačce.

Po skončení fermentace se upraví pH fermentační tekutiny 10 % roztokem sody na hodnotu 8-9 a směs se zfiltruje. Filtrát se extrahuje 3x chloroformem a spojené extrakty se odpaří za vakua. Filtrační koláč se extrahuje 4x methanolem, filtráty se spojí, za sníženého tlaku se oddestiluje rozpouštědlo a odparek se dosuší. Odparky získané z filtrátu i koláče se rozpustí ve 100 ml methanolu, roztok se smísí se 100 ml 10 % hmot. vodného roztoku chloridu sodného a směs se extrahuje 3x vždy 100 ml petroletheru. Petroletherové extrakty se spojí a protřepou 3x se 100 ml směsí methanolu a 10 % hmot. roztokem chloridu sodného v objemovém poměru 4:1. Vodně-methanolicke výtřepky se spojí a smísí s 10 % hmot. roztokem NaCl, takže výsledná směs obsahuje 40 objemových % roztoku NaCl. Tato směs se extrahuje 3x chloroformem, chloroformový extrakt se odpaří a dosuší za vakua. Získaný odparek - 391 mg - obsahoval 46 % hmot. monensinového komplexu. Podle chromatografické analýsy je v tomto komplexu zastoupen 95 % monensin A.

Příklad 2

Příprava monensinu A submersní fermentací na živné půdě s butyrátem sodným

Příprava sporové kultury a inokula se provádí jako v příkladu 1. Produkční půda má složení v hmotnostní koncentraci

sojová mouka	1,5 %
glukosa	5,0 %
butyrát sodný	0,2 %
CaCO_3	0,3 %
NaCl	0,3 %
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	0,03 %
pH	6,4

Izolace se provede rovněž stejným způsobem jako v příkladu 1. Monensinový komplex obsahuje 80 % monensinu A.

Celkový obsah monensinů v submersních kulturách je stanovován spektrofotometricky takto: 4 ml submersní kultury se extrahuje 8 ml směsí hexan-chloroform (4:1), 1 ml získaného extraktu se zředí 5x butanolem a přidají se 2 ml vanilinového činidla (3 % vanilin v 1,5 % etanolicke kyselině sírové). Směs se zahřívá 5 min. na vroucí vodní lázni a po ochlazení se ihned změřá absorbance při 526 nm. Množství monensinu se odečte z kalibrační křivky.

Jednotlivé faktory monensinového komplexu a jejich vzájemný poměr jsou určovány chromatografií na tenké vrstvě silikagelu (na deskách Silufol - Kavalier) v systému :

heptan-ethylacetát-metanol (5:4:1 V/V/V). Detekce se provádí postřikem chromatogramu 3 % roztokem vanilinu v 1,5 % etanilické kyselině sírové a následným zahřevem desky na 110 °C. Submersní kultura po skončení fermentace se extrahuje směsí hexan-chloroform (4:1) a extrakt se odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v malém množství chloroformu a použije pro nanášení na chromatogram.

Odparky získané způsobem popsaným v příkladu 1 lze použít přímo pro přípravu monensinového premixu k výrobě medikovaných krmiv pro výkrm ve velkochovech. V případě potřeby lze získat čistý monensin A. Odparek se rozpustí a odbarví aktivním uhlím a filtrát se dále čistí chromatografií na sloupci silikagelu známým postupem. K eluci se použije postupně chloroform a jeho směs s methanolem. Na základě výsledků TLC se spojí frakce obsahující žádaný faktor a z odparku se krystalizací ze směsi n-hexan-chloroform získá čistý produkt.

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob přípravy monensinu A, vyznačený tím, že se kultivuje mutantní kmen *Streptomyces cinnamonensis* 179 CCM 3504, v submersní kultuře při 25 °C až 42 °C 3 až 6 dní v kapalném živném prostředí, které obsahuje v hmotnostní koncentraci

glukosu	1 až 6 %
sojovou mouku	1 až 2 %
síran železitý	0,02 až 0,2 %
uhličitan vápenatý	0,3 %
chlorid sodný	0,3 %
valín	0,1 až 1,5 % nebo
butyrát sodný	0,05 až 0,2 %

načež se výsledný produkt izoluje známým způsobem.