



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

233 853

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 10 06 83
(21) (PV 4184-83)

(51) Int. Cl.³ C 12 N 1/20

(40) Zveřejněno 13 08 84

(45) Vydáno 01 04 87

(75) Autor vynálezu VANĚK ZDENKO RNDr. PhMr. DrSc.,
KRUMPHANZL VLADIMÍR prof. ing. DrSc., PRAHA,
ŠEVČÍK BOHUMIL prof. MVDr. DrSc., POHOŘÍ-CHOTOŮŇ,
BĚLÍK EDUARD ing. CSc., KOUŘIM, POSPÍŠIL STANISLAV ing.,
STAJNER KAREL PhMr.,
TAX JIŘÍ prom. chem., PRAHA

(54) Produkční kmen mikroorganismu *Streptomyces cinnamonensis* CCM 3658, produkující monensin A

Předmětem vynálezu je nový produkční kmen *Streptomyces cinnamonensis* CCM 3658, který se liší od standardních kmenů *Streptomyces cinnamonensis* tím, že produkuje minimálně 90 % monensinu A. Kmen je uložen ve Sbírce mikroorganismů University J. E. Purkyně.

Vynález se týká produkčního mikroorganismu *Streptomyces cinnamomensis*, který produkuje monensin A.

Pro standardní kmeny *Streptomyces cinnamomensis* je charakteristické, že produkují směs monensinů A, B, C a D s převahou monensinu A a B, přičemž monensin B má výrazně nižší biologickou aktivitu. Nežádoucí tvorbu monensinu B lze částečně potlačit vhodným složením kultivačního média s využitím prekurzorů nebo rostlinných olejů /AO 218032 a AO 225 938

Podstatou vynálezu je nový produkční kmen mikroorganismu *Streptomyces cinnamomensis* ACER-2, produkující monensin A, uložený ve Sbírce mikroorganismů University J.E. Purkyně /CCM/ v Brně pod číslem CCM 3658...

Novost kmene spočívá v tom, že na rozdíl od standardních kmenů *Streptomyces cinnamomensis* je hlavním produktem monensin A, jehož podíl v komplexu produkovaných monensinů je minimálně 90 %. Monensin A je hlavním nositelem žádaných vlastností, protože má nejpríznivější biologickou aktivitu. Nový kmen je svými vlastnostmi předurčen pro průmyslovou výrobu monensinového premixu, který bude sloužit k přípravě medikovaných krmiv pro použití ve velkochovech, přímo z usušeného mycelia bez nákladných izolací účinného monensinu A.

Studium biosyntézy monensinu ukázalo, že rozhodující stavební jednotkou monensinu A je butyrátová jednotka, jejímž přirozeným prekursorem je L-valin. Tento náš objev vedl k cílené přípravě mutantního kmene *Streptomyces cinnamomensis* ACBR-2 s kvalitativ-

ními změnami v produkci standardních metabolitů, jejichž podstatou je změněná intracelulární regulace metabolismu L-valinu.

Mutantní kmen *Streptomyces cinnamonensis* ACBR-2 byl získán z rodičovského kmene *Streptomyces cinnamonensis* EC 100-5, uloženého ve Sbírce mikrorganismů MBÚ ČSAV Praha, a to po ozáření UV-světlem. Jako zdroje záření bylo použito lampy Philips 57415 P/40 TUV 15 W. Vodná suspenze konidií kmene EC 100-5 /koncentrace konidií 10^7 mL^{-1} / byla vystavena účinkům UV-záření při teplotě 22°C za nepřetržitého promíchávání na elektromagnetickém míchadle. Expoziční dobu 30 s, odpovídající fluenci energie 150 J mm^{-2} , přežilo 0,3 % konidií v suspenzi. Tato suspenze spor po mutagením zásahu byla 42 h submersně kultivována při 36°C v kultivačním médiu o složení /hmotnostní koncentrace/:

L-asparagin /monohydrát/	0,10 %
KH_2PO_4	0,05 %
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 %
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,001 %
citrát sodný	1,00 %

Po této době byl přidán antimetabolit L-threo-2-amino-3-chlormáselná kyselina v takovém množství, aby její koncentrace v kultivačním médiu činila 0,075 %. Dále bylo submersně kultivováno 72 hodiny za stejných podmínek. Potom byly přeživší buňky vyočkovány na agarovou půdu o složení /hmotnostní koncentrace/:

L-asparagin /monohydrát/	0,10 %
KH_2PO_4	0,05 %
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,10 %
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,001 %
L-threo-2-amino-3-chlormáselná kyselina	0,075 %
agar p.a. /Difco/	2,00 %
citrát sodný	1,00 %

Po 20 dnech kultivace při 28°C ve vlhké komůrce se na povrchu agaru objevily ojedinělé kolonie. Kritériem pro selekci kmene *Streptomyces cinnamonensis* ACBR-2 byly kolonie mutantního kmene, obklopené množstvím drobných kolonií standardního typu. Mutantní kmen byl přečištěn na agarové půdě stejného složení jak uvedeno výše a jeho vlastnosti byly porovnány s vý-

chozí rodičovskou kulturou kmene *Streptomyces cinnamonensis* EC 100-5 při stacionární i submersní kultivaci.

1/ Morfologická charakteristika

Při kultivaci na půdě se sladovým a kvasinkovým výtažkem tvořil kmen ACBR-2, stejně jako rodičovský kmen EC 100-5, vzdušné mycelium s rovnými a zvlněnými sporofory. Po sedmi dnech kultivace byly sporofory obou kmenů *Streptomyces cinnamonensis* po celé délce členěny na jednotlivá konidia /spory/. Členění bylo v mikroskopu s procházejícím světlem velmi nezřetelné, bylo však potvrzeno pozorováním v elektronovém mikroskopu.

2/ Zbarvení kultur při kultivaci na agarových půdách

Při kultivaci na agarových půdách bylo sledováno zbarvení vzdušného mycelia a zbarvení difundujících pigmentů. Nebyly pozorovány žádné rozdíly. V obou případech, u rodičovského kmene i nového kmene ACBR-2, bylo vzdušné mycelium světlé, žlutobílé a difundující pigmenty světle žluté.

3/ Schopnost využívat různé zdroje uhlíku

Schopnost využívat různé zdroje uhlíku byla testována podle Shirlinga a Gottlieba /Int.J.System.Bacteriol., 16:313, 1966/ za užití devíti různých zdrojů uhlíku. Mutantní kmen ACBR-2 i rodičovský kmen EC 100-5 rostly stejně na D-glukose, glycerolu, L-arabinose, D-xylose, D-fruktose, cellobiose, L-rhamnose. Ani jeden z uvedených testovaných kmenů nerostl na sacharose. Mutantní kmen ACBR-2, na rozdíl od rodičovského kmene EC 100-5, slabě rostl na půdě s laktósou.

4/ Rezistence na L-threo-2-amino-3-chlormáseľnou kyselinu

Nový kmen *Streptomyces cinnamonensis* ACBR-2 rostl na agarových půdách /složení viz výše/ s přidavkem L-threo-2-amino-3-chlormáseľné kyseliny o hmotnostní koncentraci 0,075 %. Růst rodičovského kmene EC 100-5 byl za těchto podmínek zcela inhibován.

5/ Submersní kultivace

Mutantní kmen ACBR-2 i rodičovský kmen EC 100-5 byly submersně kultivovány na rotační třepačce s frekvencí 2,8 Hz při teplotě 36 °C v 500 ml varných baňkách plněných 50 ml

fermentační půdy. Složení fermentační půdy v hmotnostní koncentraci:

sojová mouka	1,5 %
glukosa	2,5 % pro 1. vegetativní generaci 5,0 % pro 2. vegetativní generaci
NaCl	0,3 %
CaCO ₃	0,3 %
Fe ₂ /SO ₄ /3·9H ₂ O	0,03 %
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,03 %

Půda před očkováním byla sterilizována při 120 °C a tlaku 100 kPa po dobu 35 minut.

Baňky 1. vegetativní generace byly očkovány sporovým inokulem z kultur na sporulační agarové půdě se sladovým a kvasinkovým výtažkem. Vlastní submersní kultivace probíhala ve druhé vegetativní generaci; baňky byly očkovány 2 % inokula z kultur první generace po 24 h kultivace. Kultivace druhé, produkční generace, byla ukončena po 120 h.

Mutantní kmen *Streptomyces cinnamonensis* ACBR-2 i rodičovský kmen EC 100-5 tvořily při submersní kultivaci světlehnědý /béžový/ pigment.

Antibiotická aktivita monensinu v submersních kulturách byla stanovena plotnovou difusní metodou s testovacím organismem *Bacillus subtilis* nebo chemickou spektrofotometrickou metodou s valinem.

Obsah monensinu A a B se stanoví chromatografií extraktu ze submersní kultury na tenké vrstvě /AO č. 218032/. Kvalitativní poměr obou složek se objektivně zjistí densitometrickým proměřením. Nový kmen *Streptomyces cinnamonensis* ACBR-2 tvoří minimálně 90 % monensinu A.

Z výše uvedených charakteristik je zřejmé, že nový kmen *Streptomyces cinnamonensis* ACBR-2, získaný po mutagenesi UV-zářením a následující selekcí, se liší od rodičovského kmen *Streptomyces cinnamonensis* EC 100-5 v těchto znacích:

- a/ rezistence na L-threo-2-amino-3-chlormáselnou kyselinu;
- b/ snížená schopnost využívat laktosu jako zdroj uhlíku;
- c/ potlačení produkce nežádoucího monensinu B a zvýšení obsahu monensinu A.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

233 853

Produkční kmen mikroorganismu *Streptomyces cinnamonensis* CCM 3658,
produkující monensin A.