



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

201752
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 1/14

(22) Přihlášeno 23 02 79
(21) (PV 1223-79)

(40) Zveřejněno 29 02 80

(45) Vydáno 15 08 82

(75)
Autor vynálezu

KRÁLOVCOVÁ EMANUELA ing., BLUMAUEROVÁ MARGITA RNDr.
CSc., VANĚK ZDENKO RNDr. DrSc., PRAHA (ČSSR), BRADLER GER-
TRAUD RNDr. a FÜGNER ROSEMARIE, JENA (NDR)

(54) Kmen mikroorganismu *Streptomyces galilaeus* 947 CCM 3320

Vynález se týká nového průmyslového mikroorganismu *Streptomyces galilaeus* 947, CCM 3320 produkujícího ϵ -pyrromycinon, který lze využít pro syntézu protinádorových anthracyklinových antibiotik.

Standardní kmen *Streptomyces galilaeus* JA 3043 (ZIMET, Jena) produkuje směs biologicky aktivních glykosidů ϵ -pyrromycinonu a aklavinonu. U mutantního kmene *Streptomyces galilaeus* 947 došlo genetickým zásahem k bloku v glykosidačním stupni biosyntézy těchto látek vedoucím k akumulaci volných aglykonů. Jako hlavní metabolit je produkován ϵ -pyrromycinon; v minoritním množství jsou tvořeny aklavinon, ϵ_1 -pyrromycinon a 7-deoxy- a bisanhydroderiváty ϵ -pyrromycinonu a aklavinonu.

Kmen *Streptomyces galilaeus* 947 byl získán ze standardního kmene *Streptomyces galilaeus* JA 3043 pětistupňovým selekčním postupem za použití přirozené selekce a účinku mutagenů. Kmen byl izolován z populace po účinku kyseliny dusité a jeho variabilita byla snížena přirozenou selekcí. Kyselina dusitá byla aplikována jako 0,05 M NaNO₂ v 0,2 M acetátovém pufru (pH 4,0) po dobu 25 min. Při této dávce mutagenu bylo usmrčeno 99,93 % konidií v suspensi. Změněná biosyntetická aktivita mutantního kmene byla

zjištěna tenkovrstevnou chromatografií metabolitů submersní kultury.

Dále je uvedena charakteristika vlastností mutantního kmene *Streptomyces galilaeus* 947, jehož vzorek kultury je uložen ve Sbirce kultur mikroorganismů University J. E. Purkyně v Brně pod číslem CCM 3320.

1. Morfologická charakteristika

Při kultivaci na ovesném agaru (ISP 3), na půdě s anorganickými solemi a škrobem (ISP 4) a na půdě s kvasinkovým a sladovým výtažkem (ISP 2) tvořil mutantní kmen 947 vzdušné mycelium se sporofory monopodiálně větvenými, s otevřenými spirálami se 4–6 závití. Vzdušné mycelium kmene 947 bylo méně vyvinuto než u standardního kmene JA 3043. Na asparaginové půdě s glycerolem (ISP 5), na tyrosinovém agaru (ISP 7), na Benettově agaru (Waksman S. A. The Actinomycetes. Chronica Botanica, Waltham, Mass., USA, 1950) a na substrátu s minerálním zdrojem dusíku (Gause G. F. et al., Zur Klassifizierung der Actinomyceten. VEB G. Fischer, Jena, 1958) tvořil standardní kmen dobře vyvinuté vzdušné mycelium, zatímco u mutantního kmene byly jen stopy vzdušného mycelia.

Ve tvaru a v povrchu spor nebyly podstat-

Tabulka 1: Zbarvení substrátového mycelia, vzdušného mycelia a difundujících pigmentů u mutantního kmene *Streptomyces galilaeus* 947 CCM 3320 a standardního kmene *Streptomyces galilaeus* JA 3043 po 21 dnech kultivace při 28 °C.

Kultivační půda	<i>Streptomyces galilaeus</i> 947						<i>Streptomyces galilaeus</i> JA 3043					
	Substrátové mycelium			Vzdušné mycelium			Substrátové mycelium			Vzdušné mycelium		
	Stupnice	Zbarvení	Stupnice	Zbarvení	Difundující pigmenty		Stupnice	Zbarvení	Stupnice	Zbarvení	Difundující pigmenty	
Ovesný agar	Oc 5m	červenohnědé	2-3	světle šedé	světle hnědý		Cr 5a O 3m	krémové oranžové	2-5	šedé	světle hnědý	
Skrobový agar s anorganickými solemi	Cg 7m Cr 6t	olivové světle hnědé	2-3	světle šedé	—		Co 6a	krémové	2-5	šedé	—	
Glycerol-asparaginový agar	Cr 3r	žlutohnědé	—	bílé*	—		Co 6a Oc 4b	krémové oranžové	2-4	šedé	—	
Agar s kvasinkovým a sladovým výtažkem	Cr 5m Oc 6r O 4b	krémové tmavohnědé červené	3-5	šedé	oranžový		Co 5b Oc 4s-0 4r	krémové červenohnědé	2-5	šedé	oranžový	
Benettův agar	Oc 4a	světle oranžové	—	bílé*	světle hnědý		Cr 6a Oc 4a	krémové světle oranžové	1-5	bíle-šedé	světle hnědý	
Sacharoso-nitrátový agar	Co 7a	krémové	—	—	—		Co 7a	krémové	—	bílé*	—	
Glukoso-asparaginový agar	Cr 1m	žlutooranžové	—	—	—		Co 6a Oc 1m	krémové světle žlutooranžové	1-4	bíle-šedé*	—	
Substrát s miner. zdrojem N ₂	C 6c	šedoolivové	—	bílé*	—		Cr 5a	krémové	1-4	bíle-šedé	—	

* — vzdušné mycelium málo vyvinuto

né rozdíly mezi mutantním a standardním kmenem. Oba kmeny tvořily spory s hladkým povrchem.

2. Zbarvení kultur

Pigmentace vzdušného a substrátového mycelia byla hodnocena podle Prauserovy stupnice (Z. Allg. Mikrobiol., 4:95, 1964) po 2, 4, 7, 14 a 21 dnech kultivace.

a) Zbarvení vzdušného mycelia

Vzdušné mycelium standardního i mutantního kmene bylo zbarveno v různých odstínech šedé barvy. Bílé mycelium bylo pozorováno jen u mladých dosud nevyvinutých kultur.

b) Zbarvení substrátového mycelia

Výsledky získané po 21 dnech kultivace u obou kmenů jsou uvedeny v tabulce I.

c) Zbarvení difundujících pigmentů

Mutantní kmen 947 a standardní kmen JA 3043 tvořily na ovesném agaru a na Benettově agaru světle hnědý pigment a na agaru s kvasinkovým a sladovým výtažkem oranžový pigment.

3. Fysiologické charakteristiky

a) Produkce melaninových pigmentů

Na peptonové půdě se železem a na tyrosinovém médiu tvořil mutantní kmen stejně jako standardní kmen intenzivní černohnědý pigment.

b) Asimilace zdrojů uhlíku

Výsledky získané u obou kmenů po 14 dnech kultivace na různých zdrojích uhlíku jsou uvedeny v tabulce II.

Tabulka II: Asimilace zdrojů uhlíku u mutantního kmene *Streptomyces galilaeus* 947 CCM 3320 a u standardního kmene *Streptomyces galilaeus* JA 3043 po 14 dnech kultivace

Zdroj uhlíku	Streptomyces galilaeus	
	947	JA 3043
glycerin	+++	+++
d-mannitol	+	(+)
d-sorbitol	+	+
l-arabinosa	+++	+++
rhamnosa	++	+++
d-xylosa	+++	+++
d-fruktosa	+++	+++
d-galaktosa	+++	+++
d-mannosa	+++	+++
glukosa	+++	+++
i-inositol	+++	+++
laktosa	+++	+++
maltosa	++	+++
sacharosa	+++	+++
rafinosa	++	+++
škrob	+++	+++
inulin	+++	+++
celulosa	(+)	(+)
dextrin	++	+++

(+) slabý růst
+ slabý růst
++ dobrý růst
+++ velmi dobrý růst

c) Ztekucování želatiny, redukce nitrátů, tvorba redukujících cukrů a odbourávání škrobu.

Mutantní i standardní kmen ztekucovaly želatinu, redukovaly nitráty, štěpily sacharosu na redukující cukry a odbourávaly škrob.

4. Produkce sekundárních metabolitů

Jako dalšího kritéria pro charakteristiku mutantního kmene *Streptomyces galilaeus* 947 se použila chromatografická analýza produkce sekundárních metabolitů v submersních kulturách, která je nejprůkaznějším ukazatelem rozdílu mezi mutantním a standardním kmenem.

a) Kultivace

Submersní kultivace byly prováděny na reciproké třepačce (frekvence 1,6 Hz, amplituda 80 mm) při 28 °C v 500 ml varných baňkách, plněných 60 ml půdy. Inokulační baňky byly očkované sporovým inokulem z kultury na agaru s kvasinkovým a sladovým výtažkem a kultivovány 24 h na půdě následujícího složení:

sojová mouka	2,0 %
glukosa	1,0 %
corn-steep	0,25 %
CaCO ₃	0,3 %
NaCl	0,5 %
pH:	6,5

Fermentační baňky byly očkované 5 % inokula a kultivovány 96 h na půdě stejného složení se zvýšeným obsahem glukosy (2,5 %).

b) Chromatografie

Produkce sekundárních metabolitů byla sledována tenkovrstevnou chromatografií na silikagelu impregnovaném NaHCO₃ (10 : 1) v systému chloroform-methanol (49 : 1).

Mycelium bylo odfiltrováno a extrahováno methanolem okyseleným HCl (pH 2,5–3,5), extrakt byl neutralizován amoniakem, zfiltrován a odpařen za vakua. Odparek byl rozpuštěn v chloroformu a použit pro chromatografii.

U standardního kmene *Streptomyces galilaeus* JA 3043 byl detegován komplex glykosidů ϵ -pyrromycinonu a aklavinonu spolu se 7-deoxy- a bisanhydroderiváty těchto aglykonů. Mutantní kmen *Streptomyces galilaeus* 947 neprodukuje glykosidy, jako hlavní metabolit akumuluje volný ϵ -pyrromycinon a v minoritním množství produkuje aklavinon, ϵ_1 -pyrromycinon, 7-deoxy- a bisanhydroderiváty ϵ -pyrromycinonu a aklavinonu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Kmen mikroorganismu *Streptomyces galilaeus* 947, produkující ϵ -pyrromycinon, jehož vzorek kultury je uložen ve Sbírce kultur mikroorganismů University J. E. Purkyně, Brno (CCM) pod číslem CCM 3320.