Produkce monensinů u kmenů *Streptomyces cinnamonensis* rezistentních vůči propionátu

RNDr. JIŘÍ MATĚJŮ, CSc., Mikrobiologický ústav ČSAV Praha, RNDr. JAROSLAVA KARNETOVÁ, Obvodní hygienická stanice OÚNZ Praha 10, Ing. STANISLAV POSPÍŠIL, Ing. MIROSLAV NOHÝNEK, Ing. MARIAN BERAN, PhMr. RNDr. ZDENKO VANĚK, DrSc., Mikrobiologický ústav ČSAV Praha

Klíčová slova: biogeneze, oligoether, monensin, *Streptomyces cinnamonensis*, rezistence, propionát.

Monensiny (obr. 1) se řadí v současné době mezi nejvýznamnější oligoetherová antibiotika. Vzhledem k jejich kokcidistatické aktivitě a stimulačnímu účinku na využití potravy u přežvýkavců, našly široké použití při léčbě kokcidiózy drůbeže a při výkrmu hospodářských zvířat [1].

Obr. 1. Chemická struktura monensinů

Monensin	R ¹	R ²	R ³
A	CH ₃	CH ₃	CH ₂ CH ₃
B	CH ₃	CH ₃	CH ₃
C	CH ₂ CH ₃	CH ₃	CH ₂ CH ₃
D	CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃

Biogeneticky patří monensiny mezi oligoketidy. Jejich molekula je tvořena kondenzací nízkomolekulárních prekurzorů, obdobně jako např. mastné kyseliny. Bylo zjištěno, že základní uhlíkatý skelet monensinu A vzniká z 5 acetátových, 7 propionátových a 1 butyrátové jednotky. Při syntéze monensinu B je butyrátová jednotka nahrazena dalším propionátem (obr. 2) [2, 3].

Obr. 2. Schéma biogeneze monensinu A

Sbírkový kmen *Streptomyces cinnamonensis* ATCC 15413 produkoval kromě monensinů ještě další antibioticky aktivní látky a biologicky neaktivní tmavé pigmenty [4]. Po mutagenním zásahu byly získány kmeny, u nichž byla tvorba pigmentů potlačena [5]. Doprovodné biologicky aktivní látky byly po izolaci určeny jako 1-fenazinkarboxylová a 6-(3-methyl-2-butenyl)-1-fenazinkarboxylová kyselina [6].

Produkci nežádoucích derivátů fenazinu se podařilo snížit úpravou složení kultivačního média. Zatímco v médiích obsahujících glycerol byla jejich tvorba vysoká, byl v médiích s glukosou vznik těchto látek potlačen [7].

Monensiny A a B byly ve směsi produkované sbírkovým kmenem zastoupeny v poměru 1 : 1. Bylo zjištěno, že přidáváním prekurzorů do fermentačního média lze poměr obou složek regulovat. V souladu se schématem biosyntézy se zastoupení monensinu A zvyšovalo po přidání *n*-butyrátu, zastoupení monensinu B přidáním propionátu [8]. Podobný vliv na složení produkované směsi měly L-valin, resp. L-isoleucin [9]. Mutantní kmen rezistentní k analogům valinu, produkující 90 % monensinu A [10], byl použit jako výchozí kmen pro přípravu variant rezistentních vůči propionátu a ke sledování vlivu propionátu na produkci monensinů.

Varianty byly připraveny v selekčních pokusech, při nichž byl natriumpropionát v koncentracích 0–0,25 % součástí pevného agarového média očkovaného sporovou suspenzí. Produkce monensinu byla hodnocena u 2. generace získaných kmenů plotnovou difúzní metodou. Poměr monensinů A a B byl u variant se zvýšenou produkcí určen hmotnostní spektrometrií.

Při testech vykazovalo 82 % variant produkci nižší než výchozí kmen, 14 % produkovalo 90–110 % ve srovnání s kontrolou (400 mg/l). U 4 % byla zjištěna produkce monensinu v rozsahu 110–130 %. Nejvyšší produkce bylo dosaženo u variant získaných na půdách s 0,1–0,3 % propionátu. Tyto varianty byly dále testovány na schopnost produkovat monensin při submersních kultivacích za přítomnosti 0–0,26 % propionátu. Nejvyšší produkce (140 % kontroly) bylo dosaženo při koncentraci 0,2 % propionátu v médiu.

U vybraných vyšeprodukčních variant byla dále sledována produkce monensinu po působení propionátu v koncentracích 0,3 a 0,6 % po dobu 5 min na sporovou suspenzi. Exponované spory byly vysévány na pevné agarové médium obsahující 0–0,25 % propionátu. Produkce monensinu byla hodnocena u 2. generace při submersní kultivaci. Nižší produkce (méně než 90 % kontroly) byla

naměřena u 94 % kmenů, produkce v rozmezí 90–110 % byla zjištěna u 4 % kmenů a zvýšenou produkci 120–250 % vykazovala 2 % variant. Maximální produkce (250 % kontroly) bylo dosaženo při kultivacích kmenů získaných po 5minutové inkubaci spor v médiu s 0,3 % propionátu a následném vysetí na pevné médium bez propionátu.

Jestliže byly do média při kultivacích mutantního kmen *S. cinnamonensis* přidávány prekurzory, zvyšoval produkci monensinů nejvíce propionát [8]. Stimulační efekt byl však pozorován pouze u nejnižší koncentrace (0,05 %). Stejně se projevil přídavek propionátu např. při kultivacích kmenů *Streptomyces coeruleorubidus* produkujících *daunomycin* [11]. U variant *S. cinnamonensis*, u nichž byla pozorována stimulace tvorby monensinů propionátem (přidaným při submerzních kultivacích do média), zvyšoval propionát produkci ještě při koncentraci 0,2 %. Vyšší obsah propionátu v médiu se projevil opět inhibičně. Poměr monensinů A a B, produkovaných sbírkovým kmenem a jeho výseprodukčními mutanty, byl přídavkem propionátu měněn ve prospěch monensinu B [8]. U mutanta produkujícího 90 % monensinu A [10] a u variant rezistentních k propionátu, které z něj byly získány, se působením propionátu poměr nezměnil a nebyl ovlivněn ani zvýšenou koncentrací propionátu.

Lektoroval dr. V. Jirků, CSc.

Literatura

- [1] WESTLEY J. W.: Adv. Appl. Microbiol. **22**, 1977, s. 177.
- [2] DAY L. E., CHAMBERLIN J. W., HAMILL R. L.: Antimicrob. Agents Chemother. **4**, 1973, s. 410.
- [3] CANE D. E., LIANG T. C., HASLER H.: J. Amer. Chem. Soc. **104**, 1982, s. 7274.
- [4] KRÁLOVCOVÁ E., KRUMPHANZL V., VANĚK Z.: Folia Microbiol. **29**, 1984, s. 35.
- [5] VANĚK Z., POSPÍŠIL S., TICHÝ P., TAX J., CIMBURKOVÁ E., KLÁNOVÁ K., KRUMPHANZL V.: Procs. 4th Internat. Symp. Genetics of Industrial Microorganisms, Kyoto 1982.
- [6] TAX J., SEDMERA P., VOKOUN J., URBAN J., KARNETOVÁ J., STAJNER K., VANĚK Z., KRUMPHANZL V.: Coll. Czech. Chem. Commun. **48**, 1983, s. 527.
- [7] KARNETOVÁ J., TAX J., STAJNER K., VANĚK Z., KRUMPHANZL V.: Folia Microbiol. **28**, 1983, s. 51.
- [8] POSPÍŠIL S., CIMBURKOVÁ E., KRUMPHANZL V., VANĚK Z.: Folia Microbiol. **30**, 1985, s. 30.
- [9] POSPÍŠIL S., KRÁLOVCOVÁ E., STAJNER K., TAX J., KRUMPHANZL V., VANĚK Z.: Folia Microbiol. **27**, 1982, s. 275.
- [10] POSPÍŠIL S., PETERKOVÁ M., KRUMPHANZL V., VANĚK Z.: FEMS Microbiol. Lett. **24**, 1984, s. 209.
- [11] BLUMAUEROVÁ M., MATĚJŮ J., STAJNER K., VANĚK Z.: Folia Microbiol. **22**, 1977, s. 275.

Matějů, J. - Karnetová, J. - Pospíšil, S. - Nohýnek, M. - Beran M. - Vaněk, Z.: Produkce monensinů u kmenů *Streptomyces cinnamonensis* rezistentních vůči propionátu. Kvas. prům. **32, 1986, č. 5, s. 110–111.**

Z mutantního kmene *Streptomyces cinnamonensis* produkujícího zvýšené množství monensinu A byly připraveny varianty rezistentní vůči propionátu. Při submerzních

kultivacích vykazovaly značnou variabilitu produkce (0–250 % kontroly). U vybraných rezistentů byla sledována produkce monensinů při zvýšené koncentraci propionátu; stimulace tvorby monensinů propionátem byla pozorována u 70 % sledovaných rezistentů. Nebyl zjištěn vliv propionátu na vzájemné zastoupení monensinů A a B.

Матею, Ю., Карнетова, Я., Поспишил, С., Ногинек, М., Беран, М., Ванек, З.: Продукция монэнзинов штаммами *Streptomyces cinnamonensis* резистентными в отношении пропионата. Квас. прум. **32, 1986, № 5, стр. 110–111.**

Из мутантного штамма *Streptomyces cinnamonensis*, образующего прежде всего монэнзин А, мы подготовили варианты резистентные в отношении пропионата. Во время глубокой культивации они оказали значительную вариабельность в продукции антибиотика (0–250 % контроля). В группе выбранных устойчивых мутантов мы следили за продукцией монэнзинов при повышенной концентрации пропионата: стимуляцию образования монэнзинов пропионатом мы отметили у 70 % изучаемых резистентов. Мы не установили влияние пропионата на относительное соотношение монэнзина А и Б.

Matějů, J. - Karnetová, J. - Pospíšil, S. - Nohýnek, M. - Beran, M. - Vaněk, Z.: Production of Monensins by Strains of *Streptomyces cinnamonensis* Resistant to Propionate. Kvas. prům. **32, 1986, No. 5, p. 110–111.**

Variants resistant to propionate were prepared from a mutant strain of *Streptomyces cinnamonensis* producing predominantly monensin A. During batch cultivation they exhibited considerable variability of production (0–250 % of control).

With selected resistants the production of monensins (in media with higher concentration of propionate) was examined. Stimulation of monensin synthesis by propionate was observed with 70 % of the resistants studied. Propionate did not influence the ratio between monensin A and B production.

Matějů, J. - Karnetová, J. - Pospíšil, S. - Nohýnek, M. - Beran, M. - Vaněk, Z.: Produktion der Monensine bei propionat-resistenten *Streptomyces cinnamonensis*-Stämmen. Kvas. prům. **32, 1986, Nr. 5, S. 110–111.**

Aus einem Mutanten *Streptomyces cinnamonensis*-Stamm, der höhere Menge von Monensin A produziert, werden propionat-resistente Varianten zubereitet. Diese wiesen unter Bedingungen der submersen Kultivierung eine hohe Variabilität der Produktion (0–250 % der Kontrolle). Bei ausgewählten Resistenten wurde die Produktion der Monensine bei gleichzeitig erhöhter Konzentration des Propionats verfolgt. Bei 70 % der untersuchten Resistenten wurde eine Stimulierung der Monensin-Bildung durch das Propionat beobachtet. Ein Einfluß des Propionats auf die gegenseitige Vertretung der Monensine A und B wurde nicht festgestellt.