

Produkce lasalocidu a šlechtění kmene *Streptomyces lasaliensis*

663.18 579

RNDr. N. STEINEROVÁ, CSc., RNDr. H. LIPAVSKÁ, RNDr. J. CUDLÍN, CSc., PhMr. RNDr. Z. VANĚK, DrSc., Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha

Klíčová slova: lasalocid, *Streptomyces lasaliensis*, kokcidiostatikum, ionofor, levomycin, chinomycin A, echinomycin, mutagenní zásahy

ÚVOD

Lasalocid (původně označ. jako antibiotikum X-537A), produkováný kmenem *S. lasaliensis* [1, 2], je oligoetherové antibiotikum účinné proti kokcidióze, parazitárnímu onemocnění drůbeže, vyvolané parazitickými kokcidii rodu *Eimeria*. Spolu s dalšími antikokcidiálními preparáty (salinomycin, narasin a monensin) patří do skupiny ionoforů, od nichž se však liší v iontové selektivitě. Na rozdíl od nich je schopen přenášet i bivalentní ionty jako Mg^{2+} a Ca^{2+} , což je pravděpodobně příčinou schopnosti lasalocidu působit na kmeny kokcií, které jsou již rezistentní vůči monensinu a narasinu.

Streptomyces lasaliensis produkuje též značně toxické peptidové antibiotikum chinomycin A (synonyma levomycin, echinomycin, antibiotikum X-948) [3–7]. Cílem této práce bylo najít mutanty produkující pouze lasalocid, resp. chinomycin A.

MATERIÁL A METODY

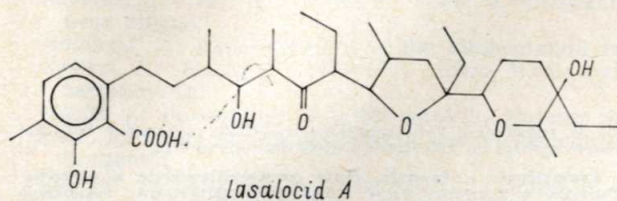
Použité mikroorganismy: *Streptomyces lasaliensis* NRRL 3382R [United States Department of Agriculture, Peoria, Illinois, USA]. *Bacillus subtilis* (testovací mikroorganismus), Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha. Kultivační média (složení v g.l⁻¹): tekutá půda: sojová mouka 15, glukosa 50, NaCl 3, CaCO₃ 3, Fe₂(SO₄)₃ 0,3, destilovaná voda; titrační půda pro testování biologické aktivity:

K₂HPO₄ 0,69, KH₂PO₄ 0,45, kvasničný extrakt 2,5, glukosa 10, agar 30. Biologická aktivita vůči *Bacillus subtilis* byla testována plotnovou difúzní metodou.

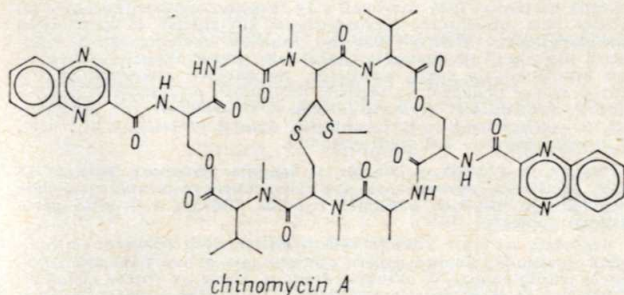
Pro tenkovrstevnou chromatografii byly použity desky Silufol a Silufol UV 254 (Kavalier, ČSSR) a PSC Fertigplatten Kieselgel 60 F-254 (Merck, NSR) a systémy heptan-ethylacetát-methanol (6:3:1 resp. 6:3:3).

Mutagenese: Kmen *S. lasaliensis* byl vystaven působení UV-záření o fluenci energie 240 a 360 J.m⁻². Mutanty získané po působení fluence energie 240 J.m⁻² (vedoucí k přežití asi 1 % populace) byly testovány na produkci antibiotik. Vybrané mutanty byly dále podrobeny přirozené selekci; po dalším stupni působení UV-záření byl z tohoto výběru získán mutant 41 L produkující pouze lasalocid. V obdobné sérii mutagenních experimentů a přirozených rozsevů byl získán mutant 61, produkující pouze chinomycin A.

Izolace produktu z kmene 41 L. Po pětidenní kultivaci byla fermentační tekutina vakuově odfiltrována přes křemelinu, 3krát promyta ethylacetátem, extrakt byl pak promyt 10 % Na₂CO₃, vodou a vysušen síranem sodným. Odparek získaný po vakuovém odpaření byl dělen preparativní TLC v soustavě hexan-ethylacetát-methanol (6:3:1). Byla získána bílá pevná látka, která byla na základě dat NMR- a hmotnostní spektrometrie a R_F hodnot identifikována jako lasalocid A.



Izolace produktu z kmene 61. Po pětidenní kultivaci bylo mycelium vakuově odfiltrováno přes křemelinu a pak se postupně 3krát rozmíchalo s acetonem. Spojené acetonové filtráty byly vakuově zahuštěny, protřepány 0,1M NaOH, vodou a vysušeny síranem sodným. Po vakuovém odpaření získaný odparek byl dělen preparativní TLC v soustavě hexan-ethylacetát-methanol (6:3:3). Byl získán slabě nažloutlý pevný produkt, který na základě srovnání dat NMR-spektrometrie s literárními údaji a dat hmotnostní spektrometrie s daty autentického vzorku je identifikován jako chinomycin A ($C_{51}H_{64}N_{12}O_{12}S_2$; M_r 1100) [5, 6].



VÝSLEDKY A DISKUSE

Z přirozených rozsevů a rozsevů po mutagenních zásazích se získaly z kmene *Streptomyces lasaliensis* mutanty produkující vždy jen jedno ze dvou antibiotik, produkovaných rodičovským kmenem. Podle hodnot TLC a srovnáním spektrálních dat (NMR- a hmotnostní spektra) s literárními údaji a s daty autentického vzorku bylo jedno antibiotikum charakterizováno jako lasalocid A, zatímco u dalšího antibiotika jde o chinomycin A, látku peptidového typu, patřící do skupiny chinoxalinových antibiotik [7—9].

Tabulka 1. Vliv intenzity vzdušnění a frekvence otáček míchadla na produkci antibiotik

Kmen	Vzdušnění [l. min ⁻¹] ^a	Frekvence otáček [Hz]	Produkce [mg. l ⁻¹]
41 L	1,0 0,6	6,5	69 200
61	1,2	8,5	76
	1,0		100
	0,8		330
	0,6		345
	0,6	6,5	418

a) Vzdušnění menší než 0,6 l. min⁻¹ nebylo možno na daném zařízení nastavit.

Byl vypracován postup kultivace obou uvedených mutantů (41 L a 61) v 5 l fermentačních laboratorních tancích. Zjistilo se, že produkce obou antibiotik závisí silně na intenzitě vzdušnění (tab. 1) a na teplotě. Zvýšení teploty kultivace na 32 °C vede ke snížení produkce na 20 %, při 37 °C je produkce téměř nulová.

Lektoroval dr. V. Jirků, CSc.

Literatura

- [1] BERGER J., RACHLIN A. I., SCOTT W. E., STERNBACH L. H., GOLDBERG M. W.: J. Am. Chem. Soc. **73**, 1951, s. 5295.
- [2] WESTLEY J. W., EVANS R. H., Jr., WILLIAMS T., STEMPER A.: Chem. Commun. **1970**, s. 71.
- [3] CARTER H. E., SCHAFFNER C. P., GOTTLIEB D.: Arch. Biochem. Biophys. **53**, 1954, s. 282.
- [4] BERGER J., LA SALA E. R., SCOTT W. E., MELTSNER B. R., STERNBACH L. H., KAISER S., TEITEL S., MACH E., GOLDBERG M. W.: Experientia **13**, 1957, s. 434.
- [5] MARTIN D. G., MIZSAK S. A., BILES C., STEWART J. C., BACZYNSKYJ L., MEULMAN P. A.: J. Antibiotics ser. A, **28**, 1975, s. 332.
- [6] KATAGIRI K., SHOJI J., YOSHIDA T.: J. Antibiotics ser. A, **15**, 1962, s. 273.
- [7] KORZYBSKI T., KOWSYK-GINDIFER Z., KURYLOWICZ W.: Antybiotyki. Vol. I, s. 254. Státní zdravotnické nakladatelství, Praha 1977.
- [8] KUROYA M., ISHIDA N., KATAGIRI K., SHOJI J., YOSHIDA T., MAYAMA M., SATO K., MATSUURA S., NIINOME Y., SHIRATORI C.: J. Antibiotics ser. A, **14**, 1961, s. 324.
- [9] MATSUURA S.: J. Antibiotics ser. A, **18**, 1965, s. 43.

Steinerová N., Lipavská H., Cudlín J., Vaněk Z.: Produkce lasalocidu a šlechtění kmene *Streptomyces lasaliensis*. Kvas. prům. **32**, 1986, No 7—8, s. 198—199.

Streptomyces lasaliensis produkuje kromě jiných látek i oligoetherové kokcidostatikum lasalocid. Přirozenou selekcí a selekcí po mutagenních zásazích byly získány jednak mutanty, produkující pouze lasalocid, jednak mutanty, produkující pouze chinomycin A. Byl vypracován způsob izolace, čištění a analytického stanovení obou látek.

Штайнерова, Н., Липавская, Е., Цудлин, И., Ванек, З.: Продукция ласалоцида и селекция штамма *Streptomyces lasaliensis*. Квас. прум. **32**, 1986, № 7—8, стр. 198—199.

Streptomyces lasaliensis образует среди прочих веществ и олигоэфирный кокцидиостатик ласалоцид. Природной селекцией и отбором после мутагенеза мы получили во-первых мутанты образующие только ласалоцид, во-вторых, хиномицин А. Мы разработали метод выделения, очистки и аналитического определения обоих веществ.

Steinerová, N. - Lipavská, H. - Cudlín, J. - Vaněk, Z.: Isolation of Lasalocid and the Improvement of a Strain of *Streptomyces lasaliensis*. Kvas. prům. **32**, 1986, No. 7—8, pp. 198—199.

Streptomyces lasaliensis produces besides other substances the oligoether coccidiostatic lasalocid. Mutants producing only lasalocid and mutants producing only quinomycin A were obtained both by natural selection and selection after mutagenic treatment. Isolation, purification and analytical determination of both compounds were worked out.

Steinerová, N., Lipavská, H., Cudlín, J., Vaněk, Z.: Produktion von Lasalocid und Züchtung des Stammes *Streptomyces lasaliensis*. Kvas. prům. **32**, 1986, Nr. 7—8, S. 198—199.

Streptomyces lasaliensis produziert ausser anderen Stoffen auch das Oligoäther-Kokzidiostatikum Lasalocid. Mittels natürlicher Selektion und Selektion nach Mutagenese wurden sowohl Mutanten, die nur Lasalocid, als auch Mutanten, die nur Chinomycin A produzieren, gewonnen. Es wurde die Methode der Isolierung, Reinigung und analytischen Bestimmung beider Stoffe ausgearbeitet.