

MIKROBIÁLNA PRODUKCIA TETRACYKLÍNU

Ing. Lukáš Hleba, PhD.

- ▶ Producenti: *Streptomyces aureofaciens* a *S. rimosus*
- ▶ *S. aureofaciens* – produkuje chlór tetracyklín viac ako tetracyklín
- ▶ *S. rimosus* – produkuje viac oxytetracyklínu ako tetracyklínu
- ▶ Nadprodukcia sa dosiahla mutagénnym činiteľom - UV žiarením
- ▶ Zo zvyšovania produkcie bolo potrebné zvýšiť aj rezistenciu produkčných kmeňov na samotný tetracyklín
- ▶ Rezistencia sa zvýšila selekciou spór v tetracyklínovom médiu
- ▶ Zvýšenie produkcie sa dosiahlo tiež hybridizáciou – tzv. biochemický mutanti

PRODUCENTI A NADPRODUKCIA

- ▶ Je zložené zo sacharózy, škrobu, tukov ako zdrojov uhlíka, síran amónny a proteínov ako zdrojov dusíka, tiež fosfáty.
- ▶ Uhličitan vápenatý sa používa pre formovanie tetracyklínových komplexov
- ▶ Potrebné sú aj: Mg, Fe, Mn, Sr, Cu, Zn a Co – sú prítomné v prírodných surovinách – melasa, sójový olej, múka z bavlníkových semien, kukuričnej múky ...
- ▶ Celkovo médium obsahuje: 30 g sacharózy, 40 g sójového oleja, 3 g výťažku z kukurice, 4g CaCO_3 , 2g síranu amónneho, 2 melasy.
- ▶ Základnou podmienkou výroby je výroba spór na sporulačnom médiu

FERMENTAČNÝ PROCES - MÉDIUM

- ▶ Tetracyklín sa tvorí z uhľovodíkov – základ fermentácie
- ▶ Degradácia sacharidov, mastných kyselín
- ▶ Čistá glukóza ako hlavný zdroj potláča produkciu tetracyklínu – katabolická represia
- ▶ Sacharóza je najčastejšie využívaný zdroj – je degradovaná na glukózu a fruktózu invertázou (β -fruktofuranozidáza)
- ▶ Produkciou amylázy zabezpečujú rozklad škrobu

FERMENTAČNÝ PROCES - UHL'OVODÍKY

- ▶ Amónne soli – najčastejší zdroj dusíka
- ▶ Pridávaním zdrojov dusíka sa zároveň reguluje pH
- ▶ Pridávajú sa tiež v podobe prírodných surovín ako: sójová múčka, orechová múčka – v podobe proteínov
- ▶ Proteázy sú produkované v druhej polovici rastovej fázy (serín proteináza, metaloproteináza)
- ▶ Prítomné sú aj exo- a endo-peptidázy

FERMENTAČNÝ PROCES - DUSÍK

- ▶ Fosfáty sú potrebné na rast
- ▶ Mnoho produkcií antibiotík sú inhibované vysokou koncentráciou fosfátov – tetracyklín nie je výnimkou
- ▶ Koncentrácia fosfátov je preto tesne pod optimálnou hranicou
- ▶ Inhibícia je spôsobená iba anorganickou formou
- ▶ Organická forma nemá vplyv na tetracyklínovú produkciu – pridáva sa vo forme výťažku z kukurice
- ▶ Mutanti, ktorý odolávajú vyššej koncentrácii fosfátov boli tiež už vyrobený

FERMENTAČNÝ PROCES - FOSFÁTY

- ▶ používajú sa dvojmocné kationy vytvárajúce komplexy s tetracyklínom
- ▶ Tvorba komplexov znižuje produkciu tetracyklínu
- ▶ Najčastejšie sa používa CaCO_3
- ▶ NaCl sa používa pre tvorbu chlór tetracyklínu
- ▶ Pri zníženej koncentrácii NaCl sa produkuje viac tetracyklínu
- ▶ Výmenou Cl^- iónov za Br^- sa kompletne zruší tvorba chlór tetracyklínu

FERMENTAČNÝ PROCES – OSTATNÉ ZLOŽKY

- ▶ Najúčinnější stimulátor tvorby CTC a TC je benzyliokyanát
- ▶ Dalšími sú fenylloctová kyselina, β -indolyloctová kyselina a α -naftyloctová kyselina – tieto kyseliny zvýšia produkciu ibá u menej produkčných kmeňov
- ▶ Kadaverín – zvýši produkciu CTC o 140 %
- ▶ Stimulačný účinok vitamínov na rast bol potvrdený tiež
- ▶ Vysoko-produkčné kmene nepotrebujú žiadne stimulátory

FERMENTAČNÝ PROCES - STIMULÁTORY

- ▶ Dôležitá je vysoká saturácia média kyslíkom a perfektné premiešavanie
- ▶ Zvyšovaním otáčok za minútu (rpm) je potrebné zvyšovať aj saturáciu
- ▶ Vysoké otáčky poškodzujú mycélium
- ▶ Výpadok saturácie na začiatku procesu výrazne ovplyvní produkciu
- ▶ Tvar fermentora je veľmi dôležitý faktor pre dobrú distribúciu kyslíka

FERMENTAČNÝ PROCES - BIOINŽINIERSTVO

- ▶ Kontinuálna kultivácia vláknitých mikroorganizmov je náročnejšia
- ▶ Kultivácia je heterogénna – oproti jednobunkových baktériam – s tým súvisia problémy z nehomogénnou produkciou ATB

FERMENTAČNÝ PROCES – KONTINUÁLNA KULTIVÁCIA

- ▶ K výrobe sa používa odpad po sladkých zemiakoch a iné škrobové odpady z poľnohospodárstva
- ▶ Používa sa druh *Streptomyces viridifuciens* – stacionárnou kultiváciou na pevnom médiu
- ▶ Optimálne zloženie média: 100 g odpadu zo sladkých zemiakov, 20 g organického dusíka (ryžové otruby, pšeničné otruby...) 2,4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4 g KH_2PO_4 , 1,8 g CaCO_3 , 0,6 g NaCl, 0,8 g MgCl, 10 g rozpustného škrobu, 0,2 g metionínu, 0,8 g histidínu, 1,6 g glutamátu sodného s počiatočnou vlhkosťou 68-72 % a vstupným pH 5,8-6,0.
- ▶ *S. viridifuciens* – produkcia tetracyklínu a chlór tetracyklínu

FERMENTAČNÝ PROCES – STACIONÁRNA KULTIVÁCIA

Postup:

- ▶ Médium sa premieša so spórami a destilovanou vodou, inkubuje sa staticky pri 26 °C po dobu 5-7 dní
- ▶ Správna morfológia baktérií sa sleduje mikroskopom
- ▶ Na začiatku procesu sú spóry rovnomerne rozvrstvené po povrchu substrátu
- ▶ Po prvom dni spóry klíčia – tetracyklín je nedetekovateľný
- ▶ Po druhom dni sa mycélium rozrastá, je v logaritmickej fáze, množstvo tetracyklínu je asi okolo 24 µg, v prípade chlórtracklínu okolo 45 µg na 1g sušeného substrátu
- ▶ V piatom dni je mycélium v stacionárnej fáze – produkcia TC (okolo 105 µg), CTC (okolo 285 µg)
- ▶ Na šiesty a siedmy deň – mycélium a spóry sú prítomné, produkcia TC a CTC nižšia
- ▶ Najviac produkcie je na konci logaritmickej fázy

FERMENTAČNÝ PROCES – STACIONÁRNA KULTIVÁCIA