



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

208437
(11) (B1)

(22) Přihlášeno 22 12 79
(21) (PV 9322-79)

(40) Zveřejněno 31 12 80

(45) Vydáno 01 02 84

(51) Int. Cl.³
C 12 P 29/00
C 12 R 1/485

(75)
Autor vynálezu

MATELOVÁ VLASTA RNDr. CSc., ROZTOKY U PRAHY, ČULÍK
KAREL RNDr., PRAHA,
BUČKO MICHAL ing. CSc. a BERTAN MILAN ing., BANSKÁ BYSTRICA

(54) Způsob výroby chlortetracyklinu s nízkým obsahem tetracyklinu

Při fermentační výrobě chlortetracyklinu se dosáhne nízkého obsahu tetracyklinu v konečném produktu snížením obsahu chloridu sodného v živné půdě na počátku fermentace a přidávkou chloridu sodného v průběhu fermentace.

Vynález se týká způsobu výroby chlortetracyklinu s nízkým obsahem tetracyklinu kultivací produkčního mikroorganismu *Streptomyces aureofaciens* v tekuté živné půdě, obsahující zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, minerální živné soli a stimulanty, za submersních podmínek.

Při biosyntéze chlortetracyklinu (dále CTC) vzniká za standardního způsobu fermentace značné množství nežádoucího tetracyklinu (dále TC),

a to od 5 až do 20 % hmot. Tento nepříznivý poměr nelze ovlivnit zvýšenou koncentrací zdroje chloru v půdě. Zvýší-li se například množství chloridu sodného ve fermentační půdě, snižuje se zároveň produkce CTC a obsah TC je buď stejný nebo dokonce vyšší než při fermentaci za standardních podmínek. Závislost produkce CTC a skladby produktu fermentace na obsahu chloridu sodného v půdě vyplývá z tabulky:

Koncentrace NaCl v půdě v % hmot.	Max. produkce CTC $\mu\text{g/ml}$	Obsah TC v produktu v % hmot. v 96. a 120. hodině fermentace	
0,12	5600	5 až 7	16 až 20
0,24	5300	5 až 7	16 až 20
0,48	5100	5 až 7	16 až 20
0,60	4900	5 až 7	16 až 20

Jak je patrné, při všech použitých koncentracích chloridu sodného ve fermentační půdě se poměr TC : CTC v průběhu fermentace mění a na konci fermentace, tj. v době maximální produkce, stoupá obsah TC až na 20 % hmot.

Poměr TC : CTC v závislosti na koncentraci chloridu sodného v průběhu fermentace se mění takto:

Koncentrace NaCl v % hmot. v půdě	Poměr TC : CTC v hodinách fermentace				
	24.	48.	72.	96.	120
0,12	40:60	7:93	6:94	6:94	20:80
0,24	40:60	7:93	6:94	6:94	16:84
0,48	50:50	7:93	6:94	6:94	16:84
0,60	50:50	7:93	6:94	6:94	20:80

Jak bylo zjištěno, snížil-li se výchozí koncentrace zdroje chloru ve fermentační půdě na určitou minimální hodnotu a je-li zdroj chloru v průběhu fermentace vhodným způsobem přidáván, nemění se výtěžek CTC a hmotnostní poměr TC : CTC je od 48. hodiny fermentace konstantní a velice příznivý, zhruba 2 : 98, a to následkem dostatečně vysoké aktuální koncentrace chloru ve fermentační půdě.

Na základě zmíněného zjištění byl vypracován podle vynálezu způsob výroby chlortetracyklinu s nízkým obsahem tetracyklinu kultivací produkčního mikroorganismu *Streptomyces aureofaciens* v tekuté živné půdě, obsahující zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, minerální živné soli a stimulanty, za submersních podmínek; podstata tohoto způsobu spočívá v tom, že se fermentace zahajuje s počátečním obsahem 0,05 až 0,10 % hmot. chloridu sodného v živné půdě, načež se v průběhu fermentace přidává chlorid sodný alespoň ve dvou dávkách v celkovém množství 0,2 až 0,75 % hmot., při poklesu obsahu chloridového iontu v živné půdě na 1,5 až 2,5 mg/ml.

Obvykle se jako zdroj chloru používá chloridu sodného, který je nejdostupnější a nejlevnější. Je ovšem použitelný i jakýkoliv jiný zdroj, jako je například kyselina chlorovodíková, který není toxický pro produkční mikroorganismus a který ani jinak nepříznivě nezasahuje do průběhu fermentace.

Vynález je blíže ilustrován následujícími příklady provedení.

Příklady provedení

Příklad 1

Fermentace byla provedena kultivací provozního produkčního mikroorganismu *Streptomyces aureofaciens* (interní označení sbírky Výzkumného ústavu antibiotik a biotransformací v Roztokách u Prahy Gama X 237) v 500 ml varných baňkách, obsahujících po 40 ml tekuté živné půdy tohoto složení (v % hmot.):

sacharosa	6
sojová mouka	3
arašidová mouka	1
melasa	0,2
kukuřičný extrakt (60 % sušiny)	0,7
uhličitan vápenatý	0,6
síran amonný	0,5
sojový olej	0,1
benzylrhodanid	2 $\mu\text{g/ml}$

Půda obsahovala dále stopová množství zinku, hořčíku, manganu a kobaltu ve formě rozpustných síranů a dusičnanů. Jako zdroj chloru obsahovala chlorid sodný v koncentraci 0,24 % hmot. V průběhu fermentace byla sledována produkce chlortetracyklinu a poměr TC : CTC. Výsledek vyplývá z tabulky.

Produkt	Hodina fermentace			
	48.	72.	96.	120.
CTC				
$\mu\text{g/ml}$	3400	4000	4800	5600
poměr TC : CTC	7:93	6:94	6:94	16:84

Příklad 2

Fermentace byla provedena jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že počáteční obsah chloridu sodného ve fermentační půdě byl snížen na 0,05 % hmot. Ve 24., 48. a 72. hodině bylo do fermentační půdy přidáno vždy po 0,1 % hmot. chloridu sodného ve formě 20%ního roztoku. V průběhu fermentace byla sledována produkce chlortetracyklinu a poměr TC : CTC. Výsledek vyplývá z tabulky.

Produkt	Hodina fermentace			
	48.	72.	96.	120.
CTC				
$\mu\text{g/ml}$	3600	5300	5800	5800
poměr TC : CTC	3:97	2:98	2:98	2:98

Příklad 3

Fermentace byla provedena jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že počáteční obsah chloridu sodného ve fermentační půdě byl snížen na 0,1 % hmot. Ve 24., 48. a 72. hodině bylo do půdy přidáno vždy po 0,05 % hmot. chloridu sodného ve formě 20%ního roztoku. V průběhu fermentace byla sledována produkce chlortetracyklinu a poměr TC : CTC. Výsledek vyplývá z tabulky.

Produkt	Hodina fermentace			
	48.	72.	96.	120.
CTC				
$\mu\text{g/ml}$	3400	5400	5400	5400
poměr TC : CTC	3:97	2:98	2:98	2:98

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby chlortetracyklinu s nízkým obsahem tetracyklinu kultivací produkčního mikroorganismu *Streptomyces aureofaciens* v tekuté živné půdě, obsahující zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, minerální živné soli a stimulanty, za submerzních podmínek, vyznačující se tím, že se fermentace zahajuje s počátečním obsahem 0,05 až

0,10 % hmot. chloridu sodného v živné půdě, načež se v průběhu fermentace přidává chlorid sodný alespoň ve dvou dávkách do celkového množství 0,20 až 0,75 % hmot., při poklesu obsahu chloridového iontu v živné půdě na 1,5 až 2,5 mg/ml.